

# Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen

**Dissertation**  
zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt den Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Stefan Wachowiak**  
geboren am 26. Oktober 1979 in Forst

### **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Reinhard Klinger, Jena**
- 2. Prof. Dr. Claus Liebmann, Jena**
- 3. Prof. Dr. Karl-Jürgen Bär, Bochum**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2011**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
AGS	(engl.) activators of G-protein signalling
AK	Antikörper
AKT/PKB	Proteinkinase B
Anti-GFP	Antikörper gegen GFP-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bad	(engl.) Bcl-2 antagonist causing cell death
BAF	(engl.) Brahma-related gene associated factor
βARK1	β-Adrenorezeptorkinase 1
BH	(engl.) breakpoint cluster region homology
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
Btk	Bruton's Tyrosine Kinase
bzw.	beziehungsweise
C2	C2-Domäne der PI-3-Kinase γ (360.-543. AS)
CAAX	C-Terminal myristylierte inaktive Form der PI-3-Kinase γ
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBR	Calcium Bindungs Region
Ci	Curie
CLSM	Confocale Laser Scanning Mikroskopie
cpm	(engl.) counts per minute; gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
DAG	Diacylglycerolphosphat
DMEM	Dulbecos MEM 4,5 g Glucose
DMEM <sub>kompl</sub>	Dulbecos MEM 4,5 g Glucose; 10 % FCS; 0,125 % (v/v) Gentamicin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure

EGF	(engl.) epidermal growth factor
EGTA	Bis(aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
engl.	englisch; Bezeichnung im Englischen
ENTH-Domäne	(engl.) Epsin N-terminal homology domain
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et aliter (und andere)
FCS / FKS	(engl.) fetal calv serum; fötales Kälberserum
FERM Domäne	benannt nach den vier Proteinen, in denen sie zuerst beschrieben wurde: 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin.
FGF-1	(engl.) fibroblast growth factor-1
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
FYVE-Domäne	Zink-Finger Domäne, benannt nach den Proteinen Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 und EEA1
(x) g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
GA	Golgi Apparat
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	(engl.) green flourescent protein; grün floureszierendes Protein
GPCR	(engl.) G-protein coupled receptor
G-Protein	heterotrimeres guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase
GRP1	(engl.) general receptor for phosphoinositides, isoform 1
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	(engl.) hours; Stunden
HEAT	(engl.) Huntington-elongation-A-subunit-TOR-motiv
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie
Hel	helikale Domäne der PI-3-Kinase $\gamma$ (544.-725. AS)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HepG2	Zelllinie eines humanen hepatozellulären Karzinoms
HL60-Zellen	(engl.) Human promyelocytic leukemia cells



IL6	Interleukin 6
IP3	Inositol-1,4,5- trisphosphat
IP4	Inositol-1,3,4,5-P <sub>4</sub>
IRS 1	Insulin Rezeptor Substrat 1
kDa	Kilodalton
KIDO	Kinase-Domäne der PI-3-Kinase $\gamma$ (726.-1102. AS)
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante, Substratkonzentration in mol/l, die zur halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion führt
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M	mol pro Liter
MCP-1	(engl.) monocyte chemotactic peptide-1
min	Minuten
mRNA	(engl.) messenger-RNA; Boten-RNA
NC-Membran	Nitrocellulosemembran
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonoxid
NT	N-Terminus der PI-3-Kinase $\gamma$ (1.-219. AS)
OD	optische Dichte
OCRL-1	(engl.) Lowe's oculocerebrorenal syndrome
p85	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>A</sub> PI-3-Kinasen $\alpha$ , $\beta$ und $\delta$
p101	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$
p84	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$
p87 <sup>PIKAP</sup>	PI-3-K $\gamma$ adapter protein of 87 kDa, nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I <sub>B</sub> PI-3-Kinase $\gamma$
p110	katalytische Untereinheit der Klasse I PI-3-Kinasen
PA	Phosphatidsäure
PAF	(engl.) platelet-activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	(engl.) phosphate-buffered saline; NaCl/Phosphatpuffer
PCR	(engl.) polymerase chain reaktion; Polymerase-Kettenreaktion
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDGF	(engl.) platelett derived growth factor

PDK-1	(engl.) phosphoinositide-dependent kinase-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration in wässriger Lösung
PH-Domäne	(engl.) pleckstrin homology domain
PHD finger	(engl.) Plant Homeo domain
PIK	Phosphoinositid Kinase
PI	Phosphatidylinositol
PI-3,4,5-P3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI-3,4-P2	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI-3,5-P2	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PI-3-P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI-4-Kinase	Phosphoinositid-4-Kinase
PI-4-P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI-4,5-P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI-5-P	Phosphatidylinositol-5-phosphat
PIP-Kinase	Phosphatidylinositolphosphat-Kinase
PKA	Protein-Kinase A
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidylserin
PTB	Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne
PX-Domäne	Phosphoinositid-Bindungs-Domäne, benannt nach P40phox- und p47phox-Domänen der NADPH-Oxidase
RBD	Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-Kinase $\gamma$ (220.-359 AS)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(engl.) rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SERCA	(engl.) sarcoplasmatic reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
SH2	(engl.) Src homology 2
SH3	(engl.) Src homology 3
SHIP	(engl.) SH2-containing inositol 5` phosphatase
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylphosphat

SDS	Natriumdodecylphosphat-Polyacrylamidelektrophorese
sec	Sekunden
Sf9-Zellen	Ovarialzelllinie des Insekts <i>Spodoptera frugiperda</i>
Tab.	Tabelle
TAC	(engl.) transverse aortic constriction
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOR	(engl.) Target of Rapamycin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
U	(engl.) units; Einheiten
U937-Zellen	human leukemic monocyte lymphoma cell line
UV	ultraviolett
vgl.	Vergleiche
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
Vol.	Volumen
VSMC	(engl.) vesicular smooth muscle cell (glatte Gefäßmuskelzelle)
WT	Wild-Type der PI-3-Kinase $\gamma$ ; p110 $\gamma$ ; gesamte PI-3-Kinase $\gamma$ (1.-1102. AS)
z.B.	zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
Gattungsnamen	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Aminosäuren: Drei-Buchstaben-Code und Ein-Buchstaben-Code:

A Ala Alanin	C Cys Cystein	D Asp Asparaginsäure
E Glu Glutaminsäure	F Phe Phenylalanin	G Gly Glycin
H His Histidin	I Ile Isoleucin	K Lys Lysin
L Leu Leucin	M Met Methionin	N Asn Asparagin
P Pro Prolin	Q Gln Glutamin	R Arg Arginin
S Ser Serin	T Thr Threonin	V Val Valin
W Trp Tryptophan	Y Tyr Tyrosin	

# Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung .....	9
1	Einleitung .....	11
1.1	Grundlagen der zellulären Kommunikation .....	11
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Aufbau und Funktion .....	12
1.3	Phosphoinositide .....	14
1.3.1	Phosphoinositid-Stoffwechsel .....	14
1.3.2	Phosphoinositide und Signaltransduktion .....	16
1.4	PI-3-Kinasen .....	17
1.4.1	Die Familie der PI-3-Kinasen .....	17
1.4.2	Regulation der Lipidkinase-Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen .....	19
1.4.3	Funktion der Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen .....	21
1.5	PI-3-Kinase $\gamma$ .....	22
1.5.1	Struktur der PI-3-Kinase $\gamma$ .....	22
1.5.2	Rolle der PI-3-Kinase $\gamma$ im Organismus .....	25
1.5.3	Subzelluläre Lokalisation und Funktion .....	28
2	Zielstellung der Arbeit .....	31
3	Material und Methoden .....	32
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	32
3.1.1	PCR .....	34
3.1.2	Klonierung der Konstrukte in TOPO-Vektor .....	35
3.1.3	Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten .....	35
3.1.4	Gelaufreinigung .....	35
3.1.5	Restriktionsverdau .....	35
3.1.6	Ligation der Konstrukte in den EGFP-C2-Vektor .....	36
3.1.7	Medien für die Bakterienkultur .....	36
3.1.8	Kultivierungsbedingungen .....	36
3.1.9	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	36
3.1.10	Transformation von <i>E. coli</i> .....	36
3.1.11	Animpfen von <i>E. coli</i> -Kulturen .....	37
3.1.12	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Alkalische Minilyse) .....	37
3.1.13	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Alkalische Lyse) .....	37
3.1.14	Lagerung von Klonen .....	37
3.2	Säugerzellkultur und transiente Transfektion .....	38
3.2.1	HEK293- und HEK293 <sub>p101</sub> -Zellkultur .....	38
3.2.2	COS7-Zellkultur .....	38
3.2.3	NIH3T3-Zellkultur .....	38
3.2.4	Transfektion mit METAFECTENE® .....	38
3.2.1	Zellfraktionierung in HEK293-Zellen .....	39
3.2.2	Zellernte und Fraktionierung .....	39
3.3	Proteinbiochemische Analysemethoden .....	40

3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	40
3.3.2	Western-Blot und Immundetektion.....	41
3.3.3	LDH-Test .....	42
3.3.4	PI-4-Kinase-Test .....	42
3.4	Mikroskopische Untersuchungen .....	43
3.4.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	43
3.4.2	Gefrierbruch-Immunmarkierung SDS-FRL (SDS-digested freeze-fracture replica labeling) .....	43
4	Ergebnisse .....	45
4.1	Untersuchung der Lokalisation von PI-3-K $\gamma$ und ihrer Domänen durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	45
4.1.1	Lokalisation des nicht fusionierten EGFPs.....	45
4.1.2	Lokalisation einer konstitutiv membranbindenden inaktiven PI-3-K $\gamma$ -CAAX -Mutante (CAAX).....	46
4.1.3	Lokalisation des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps (WT) .....	47
4.1.4	Lokalisation des N-Terminus der PI-3-K $\gamma$ .....	49
4.1.5	Lokalisation der Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-K $\gamma$ .....	50
4.1.6	Lokalisation des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps und der Ras-Bindungs-Domäne unter dem Einfluss von H-RasV12 .....	52
4.1.7	Lokalisation der C2-Domäne der PI-3-K $\gamma$ .....	53
4.1.8	Lokalisation der helikalen Domäne der PI-3-K $\gamma$ .....	55
4.1.9	Lokalisation der Kinase-Domäne der PI-3-K $\gamma$ .....	56
4.2	Untersuchung der zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen mittels Gefrierbruch-Immunmarkierung (SDS-FRL).....	58
4.2.1	Untersuchung der Plasmamembranbindung der PI-3-K $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen .....	58
4.3	Untersuchung der zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen mittels Zellfraktionierung.....	62
4.3.1	Reinheit der Fraktionen.....	63
4.3.2	Subzelluläre Verteilung der EGFP-Kontrolle.....	65
4.3.3	Subzelluläre Verteilung des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps .....	65
4.3.4	Subzelluläre Verteilung des N-Terminus der PI-3-K $\gamma$ und der Domänen in HEK 293-Zellen .....	66
5	Diskussion .....	68
5.1	Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der PI-3-K $\gamma$ in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit p101 .....	68
5.1.1	Cytosol- und Membranlokalisation des p110 $\gamma$ –Wildtyp .....	68
5.1.2	Cytosol- und Membranlokalisation der p110 $\gamma$ -Domänen.....	69
5.1.3	Kernlokalisation des p110 $\gamma$ –Wildtyp und seiner Domänen.....	75
5.2	Zelluläre Lokalisation der PI-3-K $\gamma$ und seiner Domänen in Anwesenheit der regulatorischen Untereinheit p101 .....	78
6	Schlussfolgerungen .....	80
7	Literaturverzeichnis.....	82
8	Anhang .....	97

# Zusammenfassung

Die Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  (PI-3-K  $\gamma$ ) ist im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen an vielfältigen zellulären Vorgängen wie der Immunantwort, der Regulation der Kontraktion von Kardiomyozyten oder der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt. Die PI-3-K  $\gamma$  kann dabei über ihre Lipidkinase-Aktivität, Proteinkinase-Aktivität oder direkte Protein-Protein-Interaktionen in die Signalvermittlung eingreifen. Das Enzym wird durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine aktiviert und kann darüber hinaus durch die regulatorischen Untereinheiten p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> sowie durch die GTPase Ras stimuliert werden. Nach bisherigen Erkenntnissen ist die PI-3-K  $\gamma$  vorrangig zytosolisch lokalisiert, wobei die Proteinkinase-Aktivität an eine Lokalisation in diesem Kompartiment gebunden zu sein scheint. Überexpressionsexperimente zeigten, dass die PI-3-K  $\gamma$  durch p101 und G $\beta\gamma$  oder durch aktives Ras an die Plasmamembran transloziert werden kann, um dort Phosphoinositide in der 3-Position des Inositolringes spezifisch zu phosphorylieren. Aber auch in unstimulierten Zellen konnte eine Membranbindung der PI-3-K  $\gamma$  gezeigt werden. Darüber hinaus wurde auch eine durch Agonisten hervorgerufene Kerntranslokation der PI-3-K  $\gamma$  beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, die subzelluläre Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen zu untersuchen und jene Domänen zu charakterisieren, die eine Lokalisation im Cytosol, an Membranen oder im Kern determinieren. Auch der Einfluß des Adapterproteins p101 auf diese Vorgänge sollte untersucht werden.

Dazu wurden EGFP-Fusionsproteine des p110 $\gamma$  Wildtyps und der einzelnen Enzym-Domänen hergestellt und in den Säugerzelllinien HEK 293, COS7 und NIH 3T3 exprimiert. Folgende Methoden wurden zur Untersuchung der zellulären Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen eingesetzt:

1. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
2. Elektronenmikroskopie (Gefrierätztechnik und Immunogold-Markierung)
3. Zellfraktionierung (Trennung der Zelllysate in Kern-, Membran- und Zytosolfraktion)

Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurden HEK 293-, COS7- und NIH 3T3-Zellen transient transfiziert. Bezüglich der Proteinlokalisation fanden sich zwischen den Zelllinien keine Unterschiede, so dass die Elektronenmikroskopie und Zellfraktionierung nur in HEK 293-Zellen durchgeführt wurden.

Folgende Ergebnisse wurden mit den aufgeführten Methoden erzielt:

- Der p110 $\gamma$ -Wildtyp ist auch ohne spezifische Stimulation von G-Protein-abhängigen Rezeptoren teilweise an die Plasmamembran gebunden. Auch der N-Terminus, die Ras-Bindungs-Domäne und die helikale Domäne zeigen eine eindeutige Membranbindung.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die N-terminal von der Kinase-Domäne gelegenen Enzym-Domänen unabhängig von einer Substratbindungsstelle zur Membranbindung befähigt sind. Während die einzelnen molekularen Interaktionen, die die Bindung der bisher genannten Domänen bewerkstelligen, nicht bekannt sind, könnte für die Membranbindung der Kinase-Domäne eine Bindung über die Phosphoinositid-Bindungsstelle angenommen werden.

- Die Ergebnisse zeigen, dass alle Domänen der PI-3-K  $\gamma$  bis auf die C2-Domäne Membranstrukturen binden können. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein Teil der PI-3-K  $\gamma$  ständig an Membranen gebunden vorliegt und dort nach Rezeptorstimulation aktiviert wird. Aufgrund der unspezifischen Bindung könnten neben der Plasmamembran auch intrazelluläre Membranen als Bindungspartner dienen.
- Die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$ , die die nach Literaturangaben zur Membranbindung in der Lage sein sollte, ist überraschenderweise überwiegend im Zellkern lokalisiert. Außerdem konnten Wildtyp, N-Terminus und helikale Domäne im Kern nachgewiesen werden. Das ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass diese Domänen der PI-3-K  $\gamma$  potentielle Kernlokalisationssequenzen aufweisen.
- In allen Untersuchungen zeigte sich, dass das Adapterprotein p101 keinen Einfluß auf die subzelluläre Lokalisation des Enzyms und seiner Domänen hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluß zu, dass die PI-3-K  $\gamma$  unabhängig von ihrer Enzymaktivität eine Funktion als scaffold-Protein besitzt. So könnte ein Teil des Enzympools an Membranen oder intrazelluläre Proteine gebunden vorliegen und als potentieller Interaktions- und Bindungspartner für intrazelluläre Proteine dienen und in zelluläre Steuerungsprozesse eingreifen. Weiterführende Untersuchungen zum genauen Bindungsmechanismus der einzelnen Domänen sowie fortführende Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation an intrazellulären Kompartimenten würden zum besseren Verständnis der Rolle der PI-3-K  $\gamma$  im Zellstoffwechsel beitragen.

Da die PI-3-K  $\gamma$  und ein Teil ihrer Domänen auch im Zellkern zu finden sind, ist eine funktionelle Rolle der PI-3-K  $\gamma$  im Zellkern zu vermuten. Untersuchungen zum Einfluss des Enzyms auf den kerneigenen Phosphoinositidstoffwechsel und / oder der Apoptose-Steuerung sowie der Regulation des Kernim- und exports der PI-3-K  $\gamma$  könnten dabei weitere wichtige Funktionen der PI-3-K  $\gamma$  offenbaren.



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der zellulären Kommunikation

Um die komplexe und vielgestaltige Funktion von vielzelligen Organismen zu gewährleisten, bedarf es einer koordinierten und regulierten interzellulären Kommunikation. Dabei müssen Signale der Umwelt wahrgenommen und verarbeitet sowie zwischen den einzelnen Zellen ausgetauscht werden. Die Umwelt bzw. die Zelle generieren Signale wie Licht, elektrische Impulse oder eine Vielzahl von Signalmolekülen wie z.B. Peptide, Proteine, Aminosäuren, Nukleotide, Zucker, Steroide, Fettsäurederivate oder lösliche Gase. Diese können von Zielzellen entweder durch direkten Zell-Zell-Kontakt (gap junction), über Oberflächenproteine wie z.B. spezifische Rezeptoren erkannt werden und lösen im folgenden eine zelluläre Signaltransduktionskaskade aus. Am Ende einer solchen Kaskade stehen Einflüsse auf Stoffwechsel, Funktion, Wachstum, Homöostase oder Zellzyklus der Zielzelle.

Die Bindung von Liganden an spezifische Rezeptoren erfolgt entweder an der Zellmembran oder im Inneren der Zelle im Cytosol oder Zellkern. Lipophile Signalmoleküle wie Steroide oder Schilddrüsenhormone können die Plasmamembran permeieren und werden an intrazelluläre Rezeptoren gebunden. Hydrophile Moleküle wie z.B. Proteine, Peptide oder Aminosäuren können die Zellmembran jedoch nicht überwinden. So binden diese an den extrazellulären Teil eines membranständigen Rezeptors, wodurch dieser u.a. über Bildung von sekundären Botenstoffen ein intrazelluläres Signal generiert. Nach der jeweils spezifischen Art der Signalwandlung kann man verschiedene Rezeptorsuperfamilien unterscheiden.

Ligandengesteuerte Ionenkanäle vereinigen Ligandenbindungsstelle und Ionenkanal in einem Molekül. Nach Bindung von Neurotransmittern wie z.B. Glutamat, GABA oder ACh erhöht sich die Permeabilität der Kanalpore für bestimmte Ionen, wodurch eine Veränderung des Membranpotentials und somit eine zelluläre Antwort ausgelöst wird. Nikotinerge ACh-Rezeptoren oder ionotrope Glutamat-Rezeptoren erhöhen nach Ligandenbindung ihre Permeabilität für Kationen, während GABAerge Rezeptoren die Durchlässigkeit für Anionen erhöhen. Ligandengesteuerte Ionenkanäle spielen eine wichtige Rolle in der schnellen synaptischen Übertragung im Zentralnervensystem von Wirbeltieren.

Rezeptoren mit intrinsischen Enzymaktivitäten weisen in ihrer Polypeptidkette eine extrazelluläre ligandenbindende Rezeptordomäne und eine intrazelluläre katalytische Effektdomäne auf. Die meisten Rezeptoren von diesem Typ durchspannen die Membran mit einer Polypeptidkette. Zur Klasse der Enzym-gekoppelten Rezeptoren gehören Rezeptor-Guanylyl-Cyclasen, wie z.B. der Rezeptor für das atriale natriuretische Peptid (Kuhn 2004), Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (Yaffe et al. 2001) und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie EGF, Insulin oder TGF- $\alpha$  (Schlessinger, 2000). Nach

Bindung eines extrazellulären Liganden kommt es zur Oligomerisierung monomerer Rezeptoren mit folgender Phosphorylierung an Tyrosylresten der zytoplasmatischen Domäne (Autophosphorylierung) bzw. zur Phosphorylierung anderer Proteine. Durch Bindung von Adapterproteinen an die phosphorylierten Domänen des Rezeptors wird das Signal in das Zellinnere weitergeleitet.

Bei anderen Rezeptoren liegen ligandenbindende Rezeptordomäne und Tyrosin-Kinase vermittelnde Effektordomäne nicht im selben Protein, wie z.B. bei dem TNF-Rezeptor oder IL-6-Rezeptor. Durch Ligandenbindung wird eine intrazellulär assoziierte Tyrosin-Kinase aktiviert und das Signal über Tyrosin-Phosphorylierung weitergeleitet.

Die größte Familie membrandurchspannender Rezeptoren bilden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Eine Vielzahl von strukturell sehr verschiedenen Signalmolekülen können als Liganden dienen, so z.B. Adrenalin, Serotonin, Lipidderivate, Nukleotide, Peptide. Aber auch durch physikalische Stimuli wie Licht, Geschmacks- oder Geruchsstoffe können sie aktivieren. Gemeinsames charakteristisches Strukturmerkmal dieser Rezeptoren sind sieben transmembranäre  $\alpha$ -Helices, die jeweils aus 20-30 Aminosäuren bestehen und eine hohe Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Rezeptortypen zeigen. Des weiteren besitzen sie keine eigene intrazelluläre Effektordomäne sondern sind mit einem G-Protein funktionell verbunden. Nach Ligandenbindung kommt es über einen noch nicht vollständig verstandenen Prozess zur Konformationsänderung zytoplasmatischer Rezeptorschleifen, die dann ein heterotrimeres G-Protein binden (Meng und Bourne, 2001). Dieses arbeitet nun als molekularer Schalter zwischen dem Liganden-bindenden Rezeptor und intrazellulär lokalisierten Effektorenzymen, wie z.B. Adenylatcyclasen (AC), Phospholipase C (PLC), PI-3-Kinase oder Ionenkanälen. Diese Effektorenzyme werden dadurch aktiviert bzw. moduliert und bewirken nun ihrerseits die Bildung von sekundären Botenstoffen, wie z.B. cAMP, IP<sub>3</sub>, DAG oder die Öffnung von Ionenkanälen.

## **1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Aufbau und Funktion**

G-Proteine von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören zur großen Gruppe der regulatorischen GTPasen, die nach Bindung von GTP mit Effektorenzymen interagieren und damit in zelluläre Signaltransduktionsprozesse eingreifen. Sie sind über Membrananker an der Innenseite der Plasmamembran assoziiert und bestehen als heterotrimere Proteine aus drei Untereinheiten, der  $G\alpha$ -Untereinheit mit der Bindungsstelle für GDP bzw. GTP und einer intrinsischen GTPase-Aktivität, sowie einer  $G\beta$ - und  $G\gamma$ -Untereinheit, die als  $G\beta\gamma$ -Dimer mit der  $G\alpha$ -Untereinheit assoziiert vorliegen.

G-Proteine unterliegen einem funktionellen Kreislauf von Aktivierung und Inaktivierung, durch den sie ihre Schalterfunktion ausüben. Nach Ligandenbindung an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors sowie der  $G\alpha$ -Untereinheit, wodurch die Nukleotid-Bindungstasche geöffnet und GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Der

Rezeptor fungiert dabei als Guanin-Nukleotidaustauschfaktor. Das trimere G-Protein wird so in den aktiven Zustand überführt, die Affinität der Untereinheiten zueinander verringert sich und es kommt zur Dissoziation in zwei funktionelle Einheiten, der GTP-gebundenen  $G\alpha$ -Untereinheit und dem  $G\beta\gamma$ -Dimer (Lambright, 1994). Beide funktionellen Einheiten können nun ihrerseits separat mit einem Effektor interagieren und in die Reaktionskaskade eingreifen. So interagieren  $G\alpha$ -Untereinheiten, die in die vier Familien  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12}$  eingeteilt werden, mit höchst unterschiedlichen Effektorproteinen. G-Proteine der  $G\alpha_s$ -Familie stimulieren vor allem die Adenylatcyclase mit folgender Bildung von cAMP und Stimulation der PKA, z.B. bei der  $\beta_1$ -adrenergen Stimulation des Herzens (Levitzki, 1986). Die Familie der  $G\alpha_i$ -Proteine umfasst die Subfamilien  $G\alpha_{i1-3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_z$ ,  $G\alpha_t$  (Transducin) und  $G\alpha_{gust}$  (Gustducin). Dabei hemmt  $G\alpha_i$  vor allem die AC und  $G\alpha_o$  spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Ghahremani et al., 1999, Jordan et al. 1999). Die Subfamilie  $G\alpha_t$  oder Transducin aktiviert die cGMP-Phosphodiesterase und hat so Anteil am Sehvorgang (Kaupp und Koch 1992). Die Geschmacksqualitäten bitter und süß werden durch  $G\alpha_{gust}$  über Stimulation der PLC bzw. AC vermittelt (Wong et al. 1996). Die  $G\alpha_q$ -Familie der G-Proteine aktiviert meist Phospholipase C- $\beta$  mit folgender Bildung sekundärer Botenstoffe wie  $IP_3$  und DAG. So vermittelt  $G\alpha_q$  die  $\alpha_1$ -adrenerge PLC  $\beta$ -Aktivierung und aktiviert Bruton's tyrosin kinase (Btk) (Bence et al., 1997). Die Mitglieder der  $G\alpha_{12}$ -Familie  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  haben Anteil an der Stimulation des  $Na^+/H^+$ -Austauschers sowie an der Regulation der ERK- und c-jun-Kinase-Aktivität (Fields et al., 1997).

Anfänglich glaubte man,  $G\beta\gamma$ -Dimere würden nur eine Rolle bei der  $G\alpha$ -vermittelten Signalweiterleitung spielen. Heute sind eine Reihe von  $G\beta\gamma$ -Effektoren bekannt. So werden die Phospholipase C $\beta$ -Varianten PLC $\beta_2$  und PLC $\beta_3$  direkt durch  $G\beta\gamma$ -Dimere stimuliert (Katz et al., 1992, Sternweis PC, 1994), während PLC $\beta_1$  indirekt, über Hemmung der GTPase-Aktivität von  $G\alpha_q$ , stimuliert wird (Chidiac und Ross, 1999). Auch Adenylatcyclasen werden durch  $G\beta\gamma$  moduliert. So potenziert  $G\beta\gamma$  die  $G\alpha_s$ -vermittelte Stimulation der AC-II, -IV und -VII, inhibiert aber AC-I (Sunahara et al., 1996). Einwärts-gerichtete  $K^+$ -Kanäle des Herzens können durch  $G\beta\gamma$  direkt stimuliert werden (Krapivinsky et al., 1995) andererseits werden spannungsabhängige präsynaptische  $Ca^{2+}$ -Kanäle durch  $G\beta\gamma$  inhibiert (Ikeda, 1996). Auch eine Reihe von Kinasen werden durch  $G\beta\gamma$  stimuliert. So werden neben der PI-3-Kinase  $\gamma$  auch Bruton's- und Tsk-Tyrosin-Kinase stimuliert (Stephens et al., 1997; Pumiglia et al., 1995; Langhans-Rajasekaran et al., 1995). Die  $\beta$ ARK1 wird durch  $G\beta\gamma$  an die Plasmamembran transloziert und aktiviert (Naga Prasad et al. 2005).

Die Terminierung des Signals wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt und führt zur hydrolytischen Spaltung des GTP zum GDP. Durch GTP-Hydrolyse sinkt die Affinität der  $G\alpha$ -Untereinheit zum Effektorenzym und steigt zum  $G\beta\gamma$ -Dimer mit folgender Re-Assoziation zum inaktiven Heterotrimer. Verbleibt das G-

Protein in der GDP-gebundenen inaktiven Form, ist die Reaktionskette unterbrochen und kann erst durch erneute Ligandenbindung einen neuen Transduktionszyklus durchlaufen. Die Regulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion kann über drei Wege erfolgen. Über Phosphorylierung der GPCRs auf der zytoplasmatischen Seite durch GRKs erfolgt eine Desensitivierung der GPCRs z.B. bei Dauerstimulation. GAPs und Effektorenzyme der G-Proteine wie z.B. PLC können die hydrolytische Aktivität der  $G\alpha$ -GTPase verstärken und so  $G\alpha$ -vermittelte Signalwege schneller terminieren (Berman und Gilman, 1998). Darüber hinaus ist eine Rezeptor-unabhängige Aktivierung von G-Proteinen durch AGS-Proteine beschrieben worden, z.B. von membranfernen G-Proteinen im Golgi-Apparat (Takesono, 1999; Jamora, 1997).

## 1.3 Phosphoinositide

### 1.3.1 Phosphoinositid-Stoffwechsel

Phosphoinositide sind als Membranlipide an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Ihr Grundmolekül ist das Phosphatidylinositol. Es besteht aus einer Cyclohexan-cis-1,2,3,5-trans-4,6-hexol Kopfgruppe, die auch als myo-Inositol bezeichnet wird und an die über eine Phosphodiester-Bindung Diacylglycerol gebunden ist (Abb. 1). Die Fettsäurereste des Diacylglycerols stellen meist in Position 1 Stearoyl- und in Position 2 Arachidonylreste dar. Neben PI als Grundmolekül können durch Phosphorylierung des Inositolringes an der D-3, D-4- oder D-5 Position 7 weitere Phosphoinositide gebildet werden (Abb. 1).

PI-4-Kinasen sind dabei in der Lage, PI an der D-4-Position des Inositolringes zu PI-4-P zu phosphorylieren. Es existieren zwei Typen von PI-4-Kinasen, Typ II und III. PI-4-P kann durch die Phosphoinositid-4-Phosphat 5 Kinase aus der Familie der PIP-Kinasen zu PI-4,5-P<sub>2</sub> phosphoryliert werden. PIP-Kinasen werden ebenfalls in zwei Familien (Typ I und II) mit jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Subfamilie unterteilt. Bemerkenswert ist, dass sie keinerlei Homologien zu anderen Phosphoinositid-Kinasen zeigen. Typ I PIP-Kinasen phosphorylieren PI-4-P an der D-5-Position zu PI-4,5-P<sub>2</sub>, können aber auch PI-3-P an der D-4- und D-5-Position zu PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,5-P<sub>2</sub> umsetzen und haben so die Fähigkeit, zwei verschiedene OH-Gruppen zu phosphorylieren (Rameh et al., 1997; Tolia et al., 1998). Typ II PIP-Kinasen setzen hingegen PI-5-P und PI-3-P an der 4-OH-Gruppe zu PI-4,5-P<sub>2</sub> bzw. PI-3,4-P<sub>2</sub> um (Rameh et al., 1997). Die Phosphorylierung von Phosphoinositiden an der D-3-Position wird durch PI-3-Kinasen vermittelt. Sie setzen PI, PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub> zu PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> um.

Neben der Phosphorylierung durch Kinasen spielt auch die Dephosphorylierung durch Phosphatasen eine wichtige, meist Signal-terminierende Rolle im Stoffwechsel der Phosphoinositide. Dabei sind die Phosphoinositid-5-Phosphatasen, die IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub>, PI-4,5-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> an der 5-Position dephosphorylieren, am besten erforscht. Sie arbeiten Mag-

nesium-abhängig und können nach ihrer Substratspezifität in vier Klassen eingeteilt werden (Majerus et al., 1999). Klasse I 5-Phosphatasen hydrolysieren  $IP_3$  und  $IP_4$  und haben Anteil an der Terminierung des Kalziumsignalweges. Zur Klasse II 5-Phosphatasen gehören die Plättchen-Typ-5-Phosphatase und das zu 51% identische, X-chromosomale Protein OCRL-1, wobei beide alle vier Substrate dephosphorylieren (Attree et al., 1992). Mutiertes OCRL-1 löst das Lowe-Syndrom aus, das durch eine renale Azidose, Katarakt, Glaukom und geistige Retardierung gekennzeichnet ist. Zu den Klasse III 5-Phosphatasen gehören SHIP1 und SHIP2, die  $IP_3$ ,  $IP_4$ , und  $PI-3,4,5-P_3$  hydrolysieren. SHIP1 wird vornehmlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und dephosphoryliert  $PI-3,4,5-P_3$ , um so Protein-Kinase B- und Protein-Kinase C-Signalwege zu terminieren. SHIP2 findet sich in nicht-hämatopoetischen Zellen und hat hier Anteil an der Terminierung von EGF- oder PDGF-vermittelten Signalen. Klasse IV 5-Phosphatasen sind wenig charakterisiert und hydrolysieren nur  $PI-3,4,5-P_3$ . Magnesium-unabhängige 4-OH-Phosphatasen werden in zwei Klassen eingeteilt und dephosphorylieren  $PI-3,4-P_2$  zu  $PI-3-P$  und stellen so das Hauptenzym zur Regulation dieses sekundären Botenstoffes dar (Norris et al., 1995). Die Gruppe der 3-OH-Phosphatasen greifen über die Hydrolyse von  $PI-3,4,5-P_3$  in den PI-3-Kinase-Signalweg ein. PTEN, das Produkt eines Tumor-Suppressor-Gens, ist der bekannteste Vertreter dieser Gruppe. Mutationen oder Deletionen des Gens inaktivieren das Enzym und führen zur Überstimulation des Akt/PKB-Signalweges, was eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Krebserkrankungen wie z.B. dem Glioblastom spielt (Cantley und Neel, 1999).

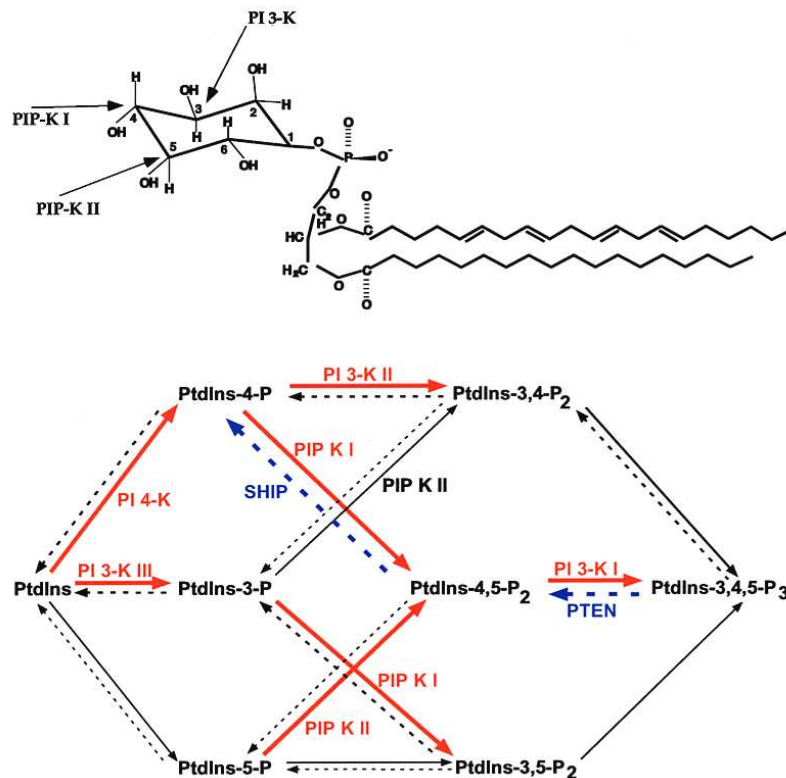


Abb. 1 Darstellung des Phosphatidylinositol mit seiner myo-Inositol-Kopfgruppe und des Diacylglycerol. Darunter findet sich eine zusammenfassende Darstellung des Phosphoinositid-Metabolismus mit den einzelnen Phosphoinositiden (schwarz), Kinasen (rot) und Phosphatasen (blau) (aus Toker 2002).

### 1.3.2 Phosphoinositide und Signaltransduktion

Phosphoinositide machen nur einen geringen Teil der Gesamtmembranlipide aus. So ist in unstimulierten Zellen Phosphatidylinositol mit ca. 10 % des Gesamtlipids am häufigsten in der Plasmamembran zu finden (Toker, 2002). PI-4-P- und PI-4,5-P<sub>2</sub> finden sich in 10- bis 100-fach niedrigeren Spiegeln in der Plasmamembran als PI. Der Anteil von PI-3-P und PI-5-P ist noch einmal 20- bis 50-fach kleiner als der von PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub>. PI-3,5-P<sub>2</sub>, PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> lassen sich in unstimulierten Zellen nicht in der Plasmamembran nachweisen; ihr Anteil in der Plasmamembran steigt jedoch nach Zellstimulation stark an. Insgesamt deutet der geringe Membrananteil der Phosphoinositide weniger auf eine strukturelle Funktion in der Plasmamembran, sondern vielmehr auf eine Funktion in der zellulären Kommunikation hin (Toker 2002). So können Phosphoinositide durch die Interaktion mit Effektorproteinen über spezifische Zieldomänen, z.B. die Pleckstrin-Homologie (PH) oder die FYVE-Domäne, dieser Proteine die Signalweiterleitung vermitteln und verschiedene zelluläre Prozesse einleiten, an deren Ende Effekte auf Zellwachstum und Proliferation, Apoptose oder Zellstoffwechsel stehen (Toker 2002). Dabei können Effektorproteine nach Bindung an Phosphoinositide innerhalb der Zelle zur Plasmamembran transloziert werden, so z.B. die Bindung von Bruton's tyrosin kinase über Bindung ihrer PH-Domäne an PI-3,4,5-P<sub>3</sub> der

Plasmamembran (Rameh und Cantley 1999). Des weiteren ist durch Bindung an Phosphoinositide eine Änderung der Proteinkonformation mit anschließender Änderung der Aktivität möglich. So kommt es z.B. nach Bindung der PKB an PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> über ihre PH-Domäne zu einer Konformationsänderung im Protein, wodurch die Aminosäurereste Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> der Phosphorylierung durch PDK1 zugänglich werden und es somit zur Aktivierung der PKB kommt (Rameh und Cantley 1999).

Weiterhin ist nach Phosphoinositid-Bindung ein Eingriff in den Phosphoinositid-Stoffwechsel selbst über Phosphorylierung durch Kinasen, Dephosphorylierung durch Phosphatasen oder Spaltung durch Lipasen wie z.B. der Phospholipase C-vermittelten Spaltung von PI-4,5-P<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG möglich.

## 1.4 PI-3-Kinasen

### 1.4.1 Die Familie der PI-3-Kinasen

Mitte der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts wurden in verschiedenen Laboratorien 3-OH-phosphorylierte Phosphoinositide wie PI-3-P und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> entdeckt (Whitman et al., 1985, 1988). Verantwortlich für die Synthese dieser Phosphoinositide sind PI-3-Kinasen, welche die Übertragung eines Phosphatrestes auf die D-3-Position des Inositolringes katalysieren und somit PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> bilden. Nach ihrer Substrat-Spezifität werden sie in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Einteilung der PI-3-Kinasen ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

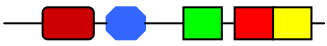

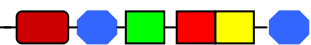
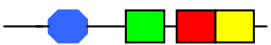
Klasse	Dömänenstruktur	Untereinheiten		Lipidsubstrate	
		katalytisch	nicht-katalytisch	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
I <sub>A</sub>		p110α p110β P110 γ, δ	p50α p55α, γ p85α, β	PI PI-4-P PI-4,5-P <sub>2</sub>	PI-4,5-P <sub>2</sub>
I <sub>B</sub>		p110 γ	p101 / p84		
II		PI-3-K-IIβ PI-3-K-IIγ PI-3-K-IIα	Clathrin	PI PI-4-P (PI-4,5-P <sub>2</sub> )	unbekannt
III		hyps34p	p150 hvs15	PI	PI



Tabelle 1 : Klassifizierung, Struktur, Untereinheiten und vorrangige Lipidsubstrate der PI-3-Kinasen

Klasse I PI-3-Kinasen bestehen als Heterodimere aus zwei Untereinheiten, einer 110-120 kDa schweren katalytischen Untereinheit (p110), von der vier Isoformen unterschieden werden können (p110  $\alpha$ , p110  $\beta$ , p110  $\gamma$  und p110  $\delta$ ) und unterschiedlichen 50-101 kDa schweren regulatorischen, nicht-katalytischen Untereinheiten (p50, p55, p85, p84/p87<sup>PIKAP</sup>, p101), nach denen die Zuordnung in die Klassen I<sub>A</sub> und I<sub>B</sub> erfolgt (Stephens et al., 1991, Suire et al. 2005, Voigt et al. 2006). PI, PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub> können *in vitro* phosphoryliert werden, wohingegen *in vivo* PI-4,5-P<sub>2</sub> als Hauptsubstrat gilt (Stephens et al., 1991). Während p110 $\alpha$  und p110 $\beta$  ubiquitär exprimiert werden, findet sich p110 $\delta$  hauptsächlich in Leukozyten. Die p110  $\gamma$  -Untereinheit ist sicher in hämatopoetischen Zellen sowie in Kardiomyozyten nachgewiesen worden, wobei ihre regulatorischen Untereinheiten ein differentielles Expressionsmuster aufweisen. So finden sich p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> jeweils in hämatopoetischen Zellen, während in Kardiomyozyten nur p84/p87<sup>PIKAP</sup>, nicht jedoch p101 nachgewiesen werden kann (Voigt et al 2006).

PI-3-Kinasen der Klasse II sind 170-210 kDa schwere Enzyme, die eine C-terminale C2-Domäne als charakteristisches Merkmal aufweisen und in die drei Isoformen PI-3-K-II $\alpha$ , PI-3-K-II $\beta$  und PI-3-K-II $\gamma$  unterteilt werden. Während PI-3-K-II $\alpha$  und PI-3-K-II $\beta$  ubiquitär exprimiert werden, findet sich PI-3-K-II $\gamma$  hauptsächlich in der Leber. Hauptsubstrate sind PI und PI-4-P *in vitro*. Über die Aktivierung und Regulation dieser PI-3-Kinase-Klasse ist nur wenig bekannt. So können das Chemokin MCP-1 und Insulin die PI-3-K-C2 $\alpha$  aktivieren, und PI-3-K-C2 $\beta$  wird in Thrombozyten durch das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  stimuliert (Brown et al., 1999; Zhang et al., 1998).

1993 identifizierten Schu et al. in Hefezellen das Protein Vps34p, den Prototypen der Klasse III PI-3-Kinasen (Schu et al., 1993). Das menschliche Homolog hvps34p konnte später ebenfalls nachgewiesen werden (Volinia et al., 1995). In der Hefe ist Vps34p mit der Serin/Threonin-Proteinkinase Vps15p und im Menschen ist hvps34p mit p150 assoziiert (Panaretou et al., 1997). Klasse III - Enzyme phosphorylieren nur PI und spielen eine wesentliche Rolle bei intrazellulären Transportprozessen sowie Endo- und Exozytosevorgängen (Wurmser et al. 1999).

Neben der Lipidkinase-Aktivität zeigen Klasse I und III, nicht jedoch Klasse II PI-3-Kinasen eine Serin/Threonin-Proteinkinase-Aktivität (Carpenter und Cantley 1998). Im Fall der Klasse I PI-3-Kinasen kann es zur Autophosphorylierung der katalytischen wie auch der regulatorischen Untereinheiten kommen, aber auch andere Substrat-Proteine wie z.B. IRS-1 können phosphoryliert werden (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999).



### 1.4.2 Regulation der Lipidkinase-Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen

Da sich PI-4,5-P<sub>2</sub>, das Hauptlipidsubstrat der Klasse I PI-3-Kinasen, in der Zellmembran befindet, muss das Enzym, um seine katalytische Arbeit aufzunehmen, an die Plasmamembran transloziert werden. Dabei spielt die Stimulation von RTK wie auch GPCR eine wichtige Rolle.

Bei Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen vermittelt die regulatorische p85-Untereinheit die Aktivierung der katalytischen Untereinheit durch Bindung an RTK. Die regulatorische Untereinheit besitzt zwei SH2-Domänen und eine Inter-SH2-Domäne, die den Kontakt zur katalytischen p110-Untereinheit herstellt. Zusätzlich zu SH2-Domänen findet sich in p85α und p85β eine SH3-Domäne, die spezifisch an Prolin-reiche PXXP-Motive bindet, sowie zwei Prolin-reiche Domänen und eine BCR-Domäne, wodurch weitere Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden können. Nach Stimulation von RTK kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosin-Resten innerhalb eines PI-3-Kinase-spezifischen-YXXM-Motivs im intrazellulären Teil der Rezeptordomäne oder eines Substrat-Proteins z.B. IRS-1. SH2-Domänen können nun mit dem Tyrosin-phosphorylierten Motiv interagieren, was eine Konformationsänderung von p85 nach sich zieht und den inhibitorischen Effekt auf die katalytische p110-Untereinheit aufhebt (Schlessinger 2000). Gleichzeitig wird so die katalytische Untereinheit an die Membran und somit in die Nähe ihres Substrates transloziert (Klippel et al. 1996). Neben der Stimulation durch RTK existieren Möglichkeiten der Rezeptor-unabhängigen Stimulation der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen. So kann die p110 β *in vitro* direkt durch Gβγ-Dimere unabhängig von ihrer p85-Untereinheit aktiviert werden (Meier et al. 1999). Die monomere GTPase Ras ist in der Lage, im GTP-gebundenen Zustand direkt mit der p110α-Untereinheit zu interagieren und diese so zu aktivieren (Rodriguez-Viciano et al. 1994, 1996), ebenso monomere GTPasen der Rho-Familie wie z.B. Rac und Cdc42, die über Interaktion mit der BCR-Domäne der p85-Untereinheit die Aktivität der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen stimulieren können (Zheng et al. 1994, Tolia et al. 1995).

Einziges Mitglied der Klasse I<sub>B</sub> PI-3-Kinasen ist die PI-3-Kinase γ, die aus einer katalytischen p110 γ -Untereinheit und einer assoziierten regulatorischen p101-Untereinheit oder p84 bzw. p87<sup>PIKAP</sup>-Untereinheit bestehen kann (Stoyanov et al. 1995, Stephens et al. 1997, Suire et al. 2005, Voigt et al. 2006). Die Untereinheiten p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> können beide jeweils mit ihrem N-Terminus die p110 γ -Untereinheit und mit ihrem C-Terminus Gβγ-Dimere binden und zeigen in diesen Bindungsregionen untereinander starke Sequenzhomologien (Voigt et al. 2006). Beide Untereinheiten unterscheiden sich jedoch in ihrer zellulären Expression sowie Co-Expression mit der katalytischen p110 γ -Untereinheit. So findet sich p101 vornehmlich in Zellen des Thymus, der Milz sowie in B- und T-Lymphozyten, wohingegen p84/p87<sup>PIKAP</sup> in hohem Maße im Herzen exprimiert wird. Beide

Untereinheiten finden sich dagegen in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen (Voigt et al. 2006).

Die Aktivierung der PI-3-Kinase  $\gamma$  erfolgt durch  $G\beta\gamma$ -Dimere nach Stimulation  $G_i$ - oder  $G_q$ -gekoppelter Rezeptoren wie z.B. den muskarinergen  $M_1$ - oder  $M_2$ -Rezeptoren (Murga et al. 1998). Der Mechanismus der  $G\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung der p110  $\gamma$  - Untereinheit und ihrer Translokation und Bindung an die Plasmamembran sowie der Rolle der regulatorischen Untereinheiten ist dabei zur Zeit nicht eindeutig geklärt.

So konnte gezeigt werden, dass p110  $\gamma$  *in vitro* durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen direkt an anionische Phospholipidvesikel bindet (Kirsch et al. 2001). Übereinstimmend damit fanden Krugmann et. al. einen Großteil der PI-3-Kinase  $\gamma$  in Abwesenheit von  $G\beta\gamma$  an Lipidvesikel assoziiert (Krugmann et al. 2002). bislang ist jedoch ungeklärt, welche Rolle die p101 bzw. p84/p87<sup>PIKAP</sup>-Untereinheiten dabei spielen. Es gibt Hinweise, dass die p110  $\gamma$  -Untereinheit unabhängig von ihrer regulatorischen Untereinheit direkt durch  $G\beta\gamma$  aktiviert werden kann (Tang und Downes 1997, Leopoldt et al. 1998). Außerdem konnten Leopoldt und Mitarbeiter (1998) zeigen, dass der N- und C-terminale Bereich der p110  $\gamma$ -Untereinheit an  $G\beta\gamma$  binden. Des weiteren wurde nachgewiesen, dass in U937-Zellen eine Stimulation der p110  $\gamma$  durch All-trans-Retinsäure unabhängig von p101 möglich ist (Beier et al. 1999). In Kardiomyozyten bildet p110  $\gamma$  mit  $\beta$ ARK1 nach anhaltender  $\beta_2$ -Rezeptorstimulation einen cytosolischen Komplex, der durch  $G\beta\gamma$ -Bindung an  $\beta$ ARK1 an den  $\beta_2$ -Rezeptor in der Plasmamembran transloziert wird (Naga Prasad et al. 2002). Über eine mögliche Rolle der regulatorischen Untereinheit p84/p87<sup>PIKAP</sup> in diesem Prozess ist zur Zeit nichts bekannt.

Andere Autoren wiesen darauf hin, dass die Untereinheiten p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> *in vivo* wie *in vitro* die Aktivierung von p110  $\gamma$  durch  $G\beta\gamma$  und damit die Bildung von PI-3,4,5-P3 verstärken (Stephens et al. 1997, Krugmann et al. 1999, Suire et al. 2005, Voigt et al. 2006).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die p101-Untereinheit die Substratspezifität der  $G\beta\gamma$ -stimulierten p110  $\gamma$  -Untereinheit *in vitro* von PI zu PI-4,5-P2 verschiebt, und so einen regulatorischen Einfluss auf die Lipidinteraktion haben könnte (Meier et al. 1999). Neuere Studien erbrachten, dass p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> als Adapter für die Membrantranslokation der p110  $\gamma$ -Untereinheit nach Co-Expression von p110  $\gamma$ , p101 bzw. p84/p87<sup>PIKAP</sup> und  $G\beta\gamma$  in HEK293-Zellen dienen, indem sie mit ihrem C-Terminus an  $G\beta\gamma$  und ihrem N-Terminus an die p110  $\gamma$ -Untereinheit binden (Brock et al. 2003, Voigt et al. 2005, 2006). Dabei fand sich für p84/p87<sup>PIKAP</sup> eine gegenüber p101 deutlich reduzierte Interaktion mit  $G\beta\gamma$  und eine deutlich schwächere Membrantranslokation (Kurig et al. 2009). Die p101 bzw. p84/p87<sup>PIKAP</sup>-vermittelte Membrantranslokation der PI-3-K  $\gamma$  nach  $G\beta\gamma$ -Stimulation ist für ihre Aktivierung aber nicht essentiell, da eine konstitutiv membran-assoziierte p110  $\gamma$ -

Untereinheit bereits enzymatisch aktiv ist und, auch in Abwesenheit von p101, erst durch Gβγ-Stimulation ihre volle Aktivität erreicht (Bondeva et al. 1998, Brock et al. 2003).

Neben Gβγ-Dimeren ist auch, wie weiter oben erwähnt, die monomere GTPase Ras im GTP-gebundenen Zustand in der Lage, die p110 γ-Untereinheit in vivo wie in vitro allosterisch zu aktivieren (Pacold et al. 2000, Suire et al. 2002). Neue Studien konnten weiter eine Membrantranslokation von p110 γ durch aktives H-Ras zeigen (Kurig et al. 2009).

### **1.4.3 Funktion der Lipidprodukte der Klasse I PI-3-Kinasen**

Die Phospholipide PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> bilden die Hauptlipidprodukte nach Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen. Diese haben durch Modulation von Effektoren wie z.B. Tyrosinkinasen, Serin/Threoninkinasen, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren und Phospholipasen Einfluss auf Zellproliferation, Hemmung der Apoptose, Zellmetabolismus, Steuerung des Zytoskeletts, Zellmigration und Vesikelbildung.

Dabei spielen PH-Domänen als spezifische Phosphoinositid-Bindungsdomänen eine entscheidende Rolle bei der Modulation von Effektoren (Fruman et al. 1999). Von den etwa 250 PH-Domänen im menschlichen Proteom binden jedoch nur ca. 20 spezifisch PI-3,4,5-P<sub>3</sub> oder PI-3,4-P<sub>2</sub> (Isakoff et al. 1998, Lemmon 2003).

So wird die Serin/Threonin-Proteinkinase B (PKB) über ihre PH-Domäne nach Bildung von PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> an die Plasmamembran transloziert und dort PDK1-abhängig an Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> phosphoryliert und somit aktiviert (Rameh und Cantley 1999). Auch PDK1 weist eine PH-Domäne auf, die mit hoher Spezifität PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> binden kann. Die Phosphorylierung an Ser<sup>473</sup> der PKB könnte über eine Substratverschiebung der PDK1 von Thr<sup>308</sup> zu Ser<sup>473</sup> durch PRK-2 (Protein kinase C related kinase 2) erfolgen (Balendran et al. 1999). Durch PKB-Aktivierung werden eine Reihe von Prozessen initiiert, die das Überleben der Zelle sichern. So kommt es zur Phosphorylierung und Inaktivierung der proapoptotischen Kinase Bad sowie zur Phosphorylierung der GSK3 und Phosphofruktokinase mit den Folgen gesteigerter Glykogen- und Proteinsynthese (Franke und Cantley 1997). Neben der Aktivierung der PKB werden durch PDK1 weitere Serin/Threoninkinasen phosphoryliert. So werden die p70S6-Kinase wie auch die PKC-Isoformen PKCδ, PKCε und PKCζ durch PDK1 aktiviert und haben so Einfluss auf die Zellproliferation (Rameh und Cantley 1999, Toker 2002). Auch Btk wird mittels einer PH-Domäne an die Plasmamembran transloziert und über einen synergistischen Mechanismus durch PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bindung und Phosphorylierung durch Tyrosinkinase aktiviert. Die Aktivierung der Btk führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von PLCγ-Isoformen. Neben der Aktivierung durch Btk kann PLCγ auch direkt durch Bindung an PI-3,4,5-P<sub>3</sub> über eine N-terminale PH-Domäne und eine Tandem-SH2-Domäne aktiviert werden. Infolgedessen wird das Membranphospholipid PI-4,5-P<sub>2</sub> durch die PLCγ hydrolytisch in DAG

und IP<sub>3</sub> gespalten. DAG führt zur Aktivierung einiger PKC-Isoformen, in deren Folge bestimmte Serin/Threoninkinasen phosphoryliert und aktiviert werden. IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Kalzium, in dessen Folge es z.B. zur Kontraktion glatter Muskelzellen kommt oder Effekte auf Zellmetabolismus und –wachstum zu verzeichnen sind (Rhee und Bae, 1997). Auch viele Guaninnukleotid-Austauschfaktoren besitzen PH-Domänen und werden so durch Phospholipide reguliert, was einen Einfluss auf Vesikelbildung und Zellmigration hat. So bindet die PH-Domäne von Grp1, einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor der kleinen G-Proteine Arf1 und Arf5, spezifisch an

PI-3,4,5-P<sub>3</sub> der Plasmamembran und erhöht so die Aktivität von Arf, das eine wichtige Rolle bei der Vesikelbildung spielt (Klarlund et al. 1998). Daneben wird die Aktivität der kleinen G-Proteine Rac, Cdc42 und RhoA durch ihren Guaninnukleotid-Austauschfaktor Vav über dessen Bindung an PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> erhöht (Rameh und Cantley 1999). Rac und Cdc42 spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zytoskelett und Zellmigration und zeigen, wie PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> in diese Vorgänge involviert sind (Toker 2002).

## **1.5 PI-3-Kinase $\gamma$**

### **1.5.1 Struktur der PI-3-Kinase $\gamma$**

Die Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit p110  $\gamma$  der PI-3-K  $\gamma$  (Abb. 2) zeigt vier Homologie-Regionen (HR1-4), die in allen Isoformen der Klasse I PI-3-Kinasen gefunden werden können. Dazu zählen die katalytische Domäne, die helikale Domäne, die C2-Domäne und die Ras-Bindungs-Domäne (Walker et al. 1999). Damit sich das Enzym kristallographisch analysieren ließ, mußte die PI-3-K  $\gamma$  N-terminal um 143 Aminosäuren verkürzt werden. Da sich in der Struktur des N-terminalen Teils (AS 144-219) keine Homologien zu den anderen Klasse I PI-3-Kinasen finden, wurde dieser Bereich nicht als Domäne beschrieben.

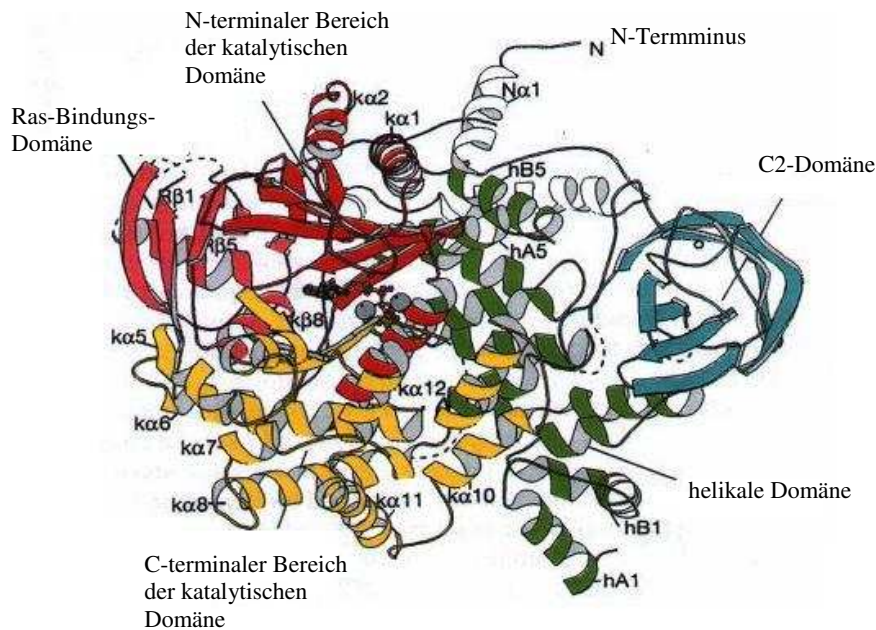


Abb. 2 : Darstellung der Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit p110  $\gamma$  der PI-3-Kinase  $\gamma$  mit dem um 143 AS verkürzten N-Terminus (weiß), der C2-Domäne (blau), der Ras-Bindungs-Domäne (rot), helikalen Domäne (grün) und der katalytischen Domäne (weinrot und gelb) (aus Walker et al. 1999).

Die katalytische Domäne (AS 726-1102) besteht aus einem kleineren N-terminalen Bereich, der die Aminosäuren 726-883 umfasst und einem größeren C-terminalen Bereich, bestehend aus den Aminosäuren 884-1092. Teile des N-Terminus ( $k\beta 3$  bis  $k\alpha 3$ ) wie auch des C-Terminus ( $k\beta 8$  bis  $k\beta 10$ ) zeigen eine den Proteinkinasen ähnliche Faltung, was die Proteinkinase-Aktivität des Enzyms erklärt. Dies ist gleichzeitig auch die meist konservierte Region der PI-3-Kinasen.

Die Verbindung zwischen N- und C-terminalem Teil der katalytischen Domäne ( $k\beta 7$  und  $k\beta 8$ ) stellt einen Teil der ATP-Bindungstasche dar und vermittelt zwei hydrophobe Kontaktstellen mit dem Adenin des ATP. Dabei interagiert eine Seitenkette des Ser 806 mit dem  $\beta$ -Phosphat und Lys 833 mit dem  $\alpha$ -Phosphat des ATP. Der PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin, gewonnen aus *Penicillium wortmanni*, bindet kompetitiv zum ATP kovalent an den konservierten Lysinrest 833 und führt so zur Hemmung der katalytischen Aktivität der Klasse I PI-3-Kinasen (Arcaro und Wymann, 1993, Wymann et al. 1996, Stoyanova et al. 1997). Die Aminosäuren 964-988 des C-terminalen Bereichs der katalytischen Domäne stellen ein der Aktivierungsschleife von Proteinkinasen analoges Segment dar und sind essentiell für die Substratspezifität der PI-3-Kinasen (Bondeva et al. 1998, Pirola et al. 2001). Aufgrund der Kristallstruktur der p110  $\gamma$ -Untereinheit entwickelten Walker et al. die Vorstellung, dass die Phosphoinositid-Kopfgruppe in einer Tasche zwischen Aktivierungsschleife, katalytischer Schleife und der C-terminalen  $k\alpha 12$ -Helix positioniert sein könnten (Walker et al. 1999).

Die helikale Domäne (AS 542-725), von anderen Autoren auch als PIK-Domäne bezeichnet, ist in allen PI-Kinasen konserviert, ihre Funktion ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Sie umfasst bei der p110  $\gamma$ -Untereinheit die Aminosäuren 545-725 und bildet mit ihren fünf A/B-Paaren aus antiparallelen Helices eine Art Rückgrad, um das sich die anderen Domänen gruppieren können (Flanagan et al. 1993, Walker et al. 1999). Dabei bleibt ein Teil der Oberfläche der B-Helices ausgespart und könnte so der Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Es konnte gezeigt werden, dass die PIK-Domäne mit der  $\beta$ ARK1 interagiert (Naga Prasat et al. 2002). Desweiteren wiesen Molendijk und Irvine (1998) darauf hin, dass bei Deletion der Helikalen Domäne die Lipidkinase-Aktivität verloren geht (Molendijk und Irvine 1998).

Die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  besteht aus den Aminosäuren 357-522, und ihre Faltung entspricht der Typ II C2-Domäne der Phospholipase C- $\delta_1$  (Essen et al. 1997). Man weiß, dass C2-Domänen die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige oder  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Bindung von Proteinen an Phospholipide vermitteln können. Walker und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass die isolierte C2-Domäne *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig an Phospholipid-Vesikel bindet und postulierten so eine mögliche Interaktion der C2-Domäne von PI-3-Kinasen mit der Plasmamembran (Walker et al. 1999).

Als weiteres Strukturmerkmal der Klasse I PI-3-Kinasen existiert die Ras-Bindungs-Domäne, welche in der p110  $\gamma$ -Untereinheit die Aminosäuren 220-356 umfasst. Sie zeigt die gleiche Faltung wie die Ras-Bindungs-Domänen der Ras-Effektoren Raf und RalGDS (Nassar et al. 1995, Huang et al. 1998, Walker et al. 1999). Sie interagiert mit dem N-terminalen Teil und zu einem geringen Grad auch mit dem C-terminalen Teil der katalytischen Domäne. Die Kristallstrukturanalyse von p110  $\gamma$  mit gebundenem H-Ras zeigte eine Interaktion mit den sogenannten „switch I“- und „switch II“-Regionen von H-Ras, die als Bindungsmotive mit Ras-Effektoren bekannt sind (Pacold et al. 2000, Moodie et al. 1995). Dabei kommt der Kontakt über die Ras-Bindungs-Domäne wie über die katalytische Domäne von p110  $\gamma$  zustande. Dies erklärt den aktivierenden allosterischen Effekt von GTP-gebundenem Ras auf die Lipidkinaseaktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$  durch Senkung des  $K_M$ -Wertes für PI-4,5- $\text{P}_2$  und Erhöhung von  $V_{\max}$  (Pacold et al. 2000, Suire et al. 2002). Kurig und Mitarbeiter konnten darüber hinaus erstmals eine durch H-Ras vermittelte Translokation von p110  $\gamma$  an die Plasmamembran zeigen (Kurig et al. 2009).

Da Klasse I PI-3-Kinasen Heterodimere sind, weisen sie als weiteres Strukturmerkmal eine regulatorische Untereinheit auf, nach der sie in die Klassen  $I_A$  und  $I_B$  unterteilt werden können. So besitzen die Klasse  $I_A$  PI-3-Kinasen an ihrem N-Terminus eine Bindungsdomäne, über die sie mit ihren regulatorischen Untereinheiten p85 $\alpha,\beta$ , p55 $\alpha,\gamma$  und p50 $\alpha$  assoziieren können. Das einzige Mitglied der Klasse  $I_B$  PI-3-Kinasen bildet die PI-3-Kinase  $\gamma$ . Sie besitzt keine p85-Bindungsdomäne an ihrem N-Terminus und kann statt dessen N-terminal mit den regulatorischen Untereinheiten p101 und p84, auch als p87<sup>PIKAP</sup>

bezeichnet, assoziiert zu denen bisher noch keinerlei Protein-Homologien bekannt sind (Stephens et al. 1997, Suire et al. 2005, Voigt et al. 2006).

## **1.5.2 Rolle der PI-3-Kinase $\gamma$ im Organismus**

### **1.5.2.1 Kardiovaskuläres System**

Die Funktion des kardiovaskulären Systems wird maßgeblich über G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren gesteuert, wobei die Initiierung einer Reihe von intrazellulären Signalkaskaden über die Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen vermittelt wird (Rockman et al. 2002). So lassen sich die PI-3-Kinasen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  in Kardiomyozyten nachweisen. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven p110  $\alpha$ -Untereinheit in Herzmuskelzellen führt zu einer erhöhten Herzgröße, wohingegen die Expression einer dominant-negativen Variante zur signifikanten Reduktion des Herzvolumens führt (Shioi et al. 2000). Dem gegenüber scheint die PI-3-K  $\gamma$  unter physiologischen Bedingungen nicht an der Regulation der Zellgröße beteiligt zu sein. So konnten Crackower et al. (2002) zeigen, dass sich nach Überexpression einer dominant negativen Variante (PI-3-K $\gamma^{-/-}$ ) in Mäusemyozyten die Zellgröße nicht verändert, sich jedoch die Zellkontraktilität stark erhöht (Crackower et al. 2002). Die Kontraktilität von Kardiomyozyten wird maßgeblich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gesteuert. So führt deren Aktivierung zur vermehrten cAMP-Synthese, in dessen Folge es zu einer erhöhten Aktivität der PKA kommt. Diese führt durch Phosphorylierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen zum erhöhten Einstrom von extrazellulärem Kalzium mit anschließend erhöhter Kontraktilität. Zugleich kommt es zur Erhöhung der Aktivität der SERCA mit erhöhter Wiederaufnahme von Kalzium in intrazelluläre Speicher und so erhöhter Relaxation (Rockman et al. 2002). So wirkt die PI-3-K  $\gamma$  als ein negativer Regulator der Kontraktilität über die Reduktion der basalen cAMP-Konzentration sowie über die Stimulierung der PAF-vermittelten NO-Produktion (Crackower et al. 2002, Aloatti et al. 2003, 2005). Patrucco und Mitarbeiter (2004) konnten weiterhin zeigen, dass durch eine Kinase-unabhängige Interaktion der PI-3-K  $\gamma$  mit der PDE3B deren cAMP-hydrolysierende Aktivität gesteigert und so der cAMP-Spiegel gesenkt wird (Patrucco et al. 2004). Des weiteren scheint die PI-3-K  $\gamma$  einen inhibitorischen Effekt auf die  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren-vermittelte Erhöhung der cAMP-Produktion zu haben, da in dominant PI-3-K  $\gamma$  negativen Kardiomyozyten der Maus nach  $\beta_2$ -Stimulation eine Erhöhung der cAMP-Konzentration und damit der Kontraktilität zu verzeichnen ist (Crackower et al. 2002). Alloatti und Mitarbeiter (2005) wiesen darauf hin, dass die PI-3-K  $\gamma$  unabhängig von Gi-gekoppelten Signalwegen die Erniedrigung der cAMP-Konzentration kontrolliert (Alloatti et al. 2005).

Neben den aufgeführten Befunden zur Rolle der PI-3-K  $\gamma$  in der Steuerung der kardialen Kontraktilität gibt es Hinweise auf einen Einfluss der PI-3-K  $\gamma$  in der Pathogenese von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. So kommt es nach anhaltender kardialer

Mehrbelastung z.B. durch essentielle Hypertonie oder Klappenfehler wie z.B. Aortenklappenstenosen kompensatorisch zur Herzhypertrophie, die in eine Herzinsuffizienz münden kann (Hunter und Chien 1999). Naga Prasad und Mitarbeiter konnten durch Nachlasterhöhung mittels TAC in Mausmodellen eine Mehrbelastung des Herzens simulieren und eine Erhöhung der PI-3-K  $\gamma$ -Aktivität in den Kardiomyozyten messen (Naga Prasad et al. 2000). Des weiteren wurde gezeigt, dass sich in dominant PI-3-K  $\gamma$ -negativen Mäuseherzen (PI-3-K  $\gamma^{-/-}$ ) nach TAC-Stimulation das typische Bild einer Herzinsuffizienz entwickelte, wohingegen sich in Kardiomyozyten mit einer PI-3-K  $\gamma$  ohne Kinaseaktivität (PI-3-K  $\gamma^{KD/KD}$ ) dieses Bild nicht zeigte (Patrucco et al. 2004). So scheint das inaktive Protein selbst ein schützender Faktor bezüglich der Entwicklung einer TAC-induzierten Herzinsuffizienz zu sein.

Die PI-3-K  $\gamma$  scheint auch eine wichtige Rolle in der nach Agonisten-Stimulation vermittelten Internalisierung von  $\beta$ -Rezeptoren zu spielen und damit Anteil an den Regulationsmechanismen der Herzinsuffizienz zu haben. So konnte gezeigt werden, dass nach repetitiver Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren die PI-3-K  $\gamma$  über ihre helikale Domäne mit der  $\beta$ -ARK1 einen funktionellen cytosolischen Komplex bildet und an die Plasmamembran von HEK 293-Zellen transloziert werden kann und dort an der Sequestration und Endozytose von  $\beta_2$ -Rezeptoren nach anhaltender Stimulation beteiligt ist (Naga Prasad et al. 2001, 2002). Es zeigt sich, dass die Überexpression der Helikalen Domäne in HEK 293-Zellen die PI-3-K  $\gamma$  /  $\beta$ ARK1-Interaktion unterbricht und so die nach Agonisten-Stimulation vermittelte Translokation des AP-2-Adaptor-Proteins an den  $\beta_2$ -Rezeptor und dessen Internalisierung und Endozytose inhibiert werden kann (Naga Prasad et al. 2002). Perrino und Mitarbeiter (2005) konnten in Kardiomyozyten zeigen, dass nach Überexpression der Helikalen Domäne eine Internalisierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren verhindert und die Stimulierbarkeit durch Agonisten erhalten bleibt (Perrino et al. 2005). Darüber hinaus konnten sie an Kardiomyozyten des Schweins mit induzierter Herzinsuffizienz nachweisen, dass nach adenoviralem Gentransfer der Helikalen Domäne die durch Agonisten stimulierbare Kontraktilität der Herzmuskelzellen wieder hergestellt werden kann (Perrino et al. 2005). Neuere Studien zeigen, dass auch die Proteinkinaseaktivität von p110  $\gamma$  für die Internalisierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren nach Agonistenstimulation nötig ist. So konnten Naga Prasad und Mitarbeiter (2005) zeigen, dass cytoskelettales Nicht-Muskel-Tropomyosin ein Substrat von p110  $\gamma$  darstellt und dessen Phosphorylierung an Serin 61 für den Prozess der  $\beta$ -Rezeptorinternalisierung nötig ist (Naga Prasad et al. 2005).

Im Gefäßsystem scheint die PI-3-K  $\gamma$  einen Einfluss auf die Angiotensin II vermittelte Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen zu haben (Macrez et al. 2001). So vermittelt die PI-3-K  $\gamma$  nach Angiotensin II-Stimulation zum einen die Aktivierung von Rac mit folgender Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Molekülen und ist zum anderen



erforderlich für einen verstärkten Einstrom extrazellulären Kalziums nach PKB-Aktivierung (Vecchione et al.2005).

### 1.5.2.2 Leukozyten und Thrombozyten

Die PI-3-K  $\gamma$  wurde erstmals in neutrophilen Granulozyten sowie in U937-Zellen des Schweins nachgewiesen, so dass eine Rolle des Enzyms bei Entzündung und Blutgerinnung möglich schien (Stephens et al. 1994).

Die akute und chronische Entzündungsreaktion wird maßgeblich durch Chemokine wie z.B. IL8, fMLP oder Komplementfaktoren wie C5a gesteuert. Diese binden an G-Proteingekoppelte-Rezeptoren, in deren Folge es zur Aktivierung von Klasse I PI-3-Kinasen mit anschließender Mehrproduktion von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> kommt. So werden eine Reihe von zellulären Reaktionen mit dem Ziel der Beseitigung des Entzündungsreizes wie z.B. Migration in das entzündete Gewebe, Phagozytose, Degranulation oder O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion initiiert. Die Rolle der PI-3-K  $\gamma$  im Entzündungsprozess konnte an dominant PI-3-K  $\gamma$ -negativen (PI-3-K  $\gamma^{-/-}$ ) Leukozyten (Makrophagen, Granulozyten) im Mausmodell untersucht werden. Diese Mäuse waren lebensfähig und haben sich normal entwickelt, wiesen jedoch deutliche Einschränkungen in der Immunabwehr auf (Wymann et al. 2003). So zeigte sich eine herabgesetzte Migrationsfähigkeit von phagozytierenden Zellen wie z.B. Makrophagen nach Stimulation mit Chemokinen wie z.B. IL8 oder C5a (Hirsch et al. 2000). Des weiteren konnte eine verringerte Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in Entzündungsbereiche festgestellt werden, wodurch es nur zu einer unzureichenden Beseitigung des Entzündungsreizes kam (Hirsch et al. 2000). In Modellen einer akuten Pankreatitis konnte in PI-3-K  $\gamma$ -negativen Mäusen eine Reduzierung der Neutrophilen-Infiltration sowie eine Reduktion von Nekrosen im Pankreasgewebe gefunden werden (Lupia et al. 2004). So scheint die PI-3-K  $\gamma$  einen entscheidenden Anteil an der Unterhaltung von Entzündungsreaktionen zu haben, und könnte somit Ziel neuer Therapiemöglichkeiten von chronischen Entzündungen wie z.B. der chronischen Polyarthritits oder der Arteriosklerose sein. Patrucco und Mitarbeiter (2004) wiesen darauf hin, dass eine Kinase-aktive PI-3-K  $\gamma$  für die chemotaktische Funktion und Migration von Leukozyten nötig ist, da sich in Kinase-inaktiven (PI-3-K  $\gamma^{KD/KD}$ ) Leukozyten eine deutlich reduzierte Entzündungsreaktion zeigte (Patrucco et al. 2004). Darüber hinaus zeigten PI-3-K  $\gamma^{-/-}$ -Mastzellen eine verringerte Histaminausschüttung nach Antigen-IgE-Stimulation, und so scheint die PI-3-K  $\gamma$  eine wichtige Rolle bei allergischen wie anaphylaktischen Reaktionen zu spielen (Wymann et al. 2003).

In T-Zellen konnte die Beteiligung der PI-3-K  $\gamma$  an der PKB-Phosphorylierung, Zellmigration sowie T-Zell-Polarisation nachgewiesen werden (Nombela-Arrieta et al. 2004).

Die Aggregation von Thrombozyten ist der entscheidende erste Schritt in der Blutstillung. In PI-3-K  $\gamma^{-/-}$ -Thrombozyten wurden eine verminderte ADP-vermittelte

Plättchenaggregation und eine verringerte Aktivierung von Fibrinogen-Rezeptoren festgestellt, was auf eine Funktion der PI-3-K  $\gamma$  in der Blutstillung hinweist (Hirsch et al. 2001). Darüber hinaus zeigte sich ein vermindertes Auftreten von ADP-induzierten thromboembolischen Ereignissen in PI-3-K  $\gamma^{-/-}$ -Thrombozyten (Hirsch et al. 2001).

### 1.5.3 Subzelluläre Lokalisation und Funktion

Die PI-3-K  $\gamma$  kann durch G $\beta\gamma$ -Dimere nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden und dabei über ihre Lipidkinase-Aktivität, Proteinkinase-Aktivität oder direkte Protein-Protein-Interaktion in die Signalvermittlung eingreifen.

So kommt es *in-vitro* nach G $\beta\gamma$ -Stimulierung zur Autophosphorylierung der PI-3-K  $\gamma$  an Serin 1101, wobei im Gegensatz zu Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen die Lipidkinase-Aktivität nicht gehemmt wird (Czupalla et al. 2003). Erste Hinweise für eine spezifische zelluläre Relevanz der Proteinkinase-Aktivität liefern Bondeva und Mitarbeiter (1998). Sie zeigen, dass eine Lipidkinase-inaktive Mutante der PI-3-K  $\gamma$  durch ihre verbleibende Proteinkinase-Aktivität MAPK aktivieren kann (Bondeva et al. 1998). Diese Funktion könnte an eine cytosolische Lokalisation des Enzyms gekoppelt sein, da ein konstitutiv Membran-gebundenes PI-3-Kinase  $\gamma$ -CAAX- Konstrukt dazu nicht in der Lage ist.

Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-K  $\gamma$  dagegen ist an die Bindung Phosphoinositid-haltiger Membranen gekoppelt. Nach Rezeptorstimulation kommt es zur sekundenschnellen Translokation des Enzyms vom Cytosol an Membranen und zur Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub>, wodurch die PKB aktiviert wird. (Stephens et al 1994, Naccache et al. 2000). G $\beta\gamma$ -Dimere können das Enzym zwar aktivieren, für eine Membrantranslokation sind sie jedoch nicht ausreichend (Krugmann et al. 2002). Erst über die Interaktion von G $\beta\gamma$  mit p101 kann die PI-3-K  $\gamma$  nach Überexpression in HEK293-Zellen vom Cytosol an die Plasmamembran transloziert werden (Brock et al. 2003). Weiterhin ist aktives H-Ras in der Lage die PI-3-K  $\gamma$  an die Plasmamembran zu dirigieren (Kurig et al. 2009). Es kann jedoch auch in unstimulierten Zellen neben einer cytosolischen Lokalisation immer eine Membranassoziation der PI-3-K  $\gamma$  nachgewiesen werden (Stephens et al. 1994, Kular et al. 1997). Es ist unbekannt, welche Mechanismen eine Membranbindung in unstimulierten Zellen bedingen. Prinzipiell kann die Membran-assoziation cytosolisch lokalisierter Enzyme wie der PI-3-K  $\gamma$  durch Protein-Lipid oder Protein-Protein-Interaktion erfolgen. Im Rahmen einer Protein-Lipid-Interaktion kann die Membranassoziation durch Bindung von bestimmten Zieldomänen im Protein an entsprechende Phosphoinositide in der Membran vermittelt werden (Tabelle 2). Eine bekannte Phosphoinositid-Zieldomäne findet sich in der PI-3-K  $\gamma$  jedoch nicht. Die Kinase-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  stellt den Ort der Bindung und Katalyse des Hauptsubstrates PI-4,5-P<sub>2</sub> *in vivo* dar. Dabei ist denkbar, dass eine Membranassoziation über die Kinase-Domäne im Sinne einer Protein-Lipid-Interaktion erfolgen kann. Walker und Mitarbeiter wiesen darauf hin, dass die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  an multilamellare Phospholipidvesikel bindet.

Phosphoinositid	Zieldomäne <i>in vivo</i>
PI-3-P	FYVE, PX
PI-4-P	PH
PI-5-P	PHD-Finger
PI-3,4-P <sub>2</sub>	PH
PI-3,5-P <sub>2</sub>	GRAM
PI-4,5-P <sub>2</sub>	PH, ENTH, Tubbby, FERM
PI-3,4,5-P <sub>3</sub>	PH, ENTH

Tabelle 2 : Darstellung der einzelnen Phosphoinositide und ihrer Zieldomänen *in vivo*. (nach Lemmon 2003)

Weiterhin sind aber auch Protein-Protein-Interaktionen als Membranbindungsmechanismus möglich. Die PI-3-K  $\gamma$  bindet über ihre Ras-Bindungsdomäne an Ras und wird so aktiviert (Pacold et al. 2000). Neue Studien konnten dabei erstmals eine Membrantranslokation des Enzyms durch aktives H-Ras nachweisen (Kurig et al. 2009). Die helikale Domäne der PI-3-K  $\gamma$  zeigt Strukturähnlichkeiten zu HEAT-Motiven, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Walker et al. 1999).

Neben der Protein- und Lipidkinase-Aktivität kann die PI-3-K  $\gamma$  eine Kinase-unabhängige Interaktion mit der PDE3B in Kardiomyozyten eingehen und durch deren Aktivierung die Kontraktionsfähigkeit von Kardiomyozyten verringern (Patrucco et al. 2004). Hierbei ist jedoch unbekannt, wo in der Zelle diese Interaktion stattfindet.

Darüber hinaus wird ein Teil der PI-3-K  $\gamma$  auch im Zellkern gefunden. So läßt sich ein 117 kDa-Protein im Zellkern von glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen, das große Ähnlichkeit mit p110  $\gamma$  zeigt und möglicherweise durch kerneigene G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Proteine aktiviert wird (Bacqueville et al. 2001). Des weiteren kommt es in HepG2-Zellen nach Serumstimulation G $\beta\gamma$ -abhängig zur Translokation überexprimierter PI-3-K  $\gamma$  vom Cytosol in den Zellkern (Metjian et al. 1999). Diese Lokalisationsänderung ist unabhängig von p101. Insgesamt gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass ein autonomer Phosphoinositid-Stoffwechsel des Kerns maßgeblich an der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt ist (Bacqueville et al. 2001).

Die regulatorischen Untereinheiten p101 und p84/p87<sup>PIKAP</sup> zeigen zur katalytischen Untereinheit wie auch untereinander ein differentes subzelluläres Verteilungsmuster. So zeigt p101 nach Expression als EGFP-Fusionsprotein in HEK 293-Zellen eine vornehmliche Lokalisation im Zellkern mit schwächerer cytoplasmatischer Verteilung (Voigt et al. 2004). Die regulatorische Untereinheit p84/p87<sup>PIKAP</sup> findet sich

dagegen nach Expression als EGFP-Fusionsprotein in HEK 293- und COS7-Zellen als fast ausschließlich cytosolisch lokalisiert wieder.

Nach Co-Expression von katalytischer und regulatorischer Untereinheit zeigen sich ebenfalls unterschiedliche Expressionsmuster. So transloziert ein Großteil von p101 unter Einfluss von p110  $\gamma$  vom Zellkern in das Cytosol von HEK 293-Zellen, wohingegen für die katalytische Untereinheit keine Lokalisationsänderung gefunden wird (Voigt et al. 2004). Nach Überexpression von p84/p87<sup>PIKAP</sup> und p110  $\gamma$  findet sich für beide Untereinheiten weiterhin eine cytosolische Lokalisation (Voigt et al. 2006).

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die PI-3-K  $\gamma$  wird in der Literatur als ein vorrangig zytosolisch lokalisiertes Enzym beschrieben, das nach Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an die Plasmamembran transloziert, dem Ort seiner Lipidkinase-Aktivität. Die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase  $\gamma$ , die zur Aktivierung der MAPK führt, scheint an eine cytosolische Lokalisation gebunden zu sein (Bondeva et al. 1998).

In Zellfraktionierungsexperimenten unserer Arbeitsgruppe konnte in unstimulierten U937-Zellen eine Membranlokalisation von p110  $\gamma$  nachgewiesen werden, die sich nach Stimulation mit FKS verstärkte (Kirsch C. 2005). Des weiteren ist bekannt, dass p110  $\gamma$  mit dem N-terminalen Teil des Enzyms (aa 37-773) *in vitro* über hydrophobe Wechselwirkungen an anionische Phospholipidvesikel ohne Beteiligung anderer Proteine binden kann (Kirsch et al. 2001). Bisher ist jedoch ungeklärt, welche Bereiche des Enzyms an die Plasmamembran bzw. an Membranen binden und welchen Einfluss die regulatorische p101-Untereinheit darauf hat. Darüber hinaus ist auch eine Lokalisation des Enzyms im Kern bekannt. So wird die konstitutiv exprimierte PI-3-K  $\gamma$  wie auch nach Überexpression anteilig im Zellkern nachgewiesen. Es ist jedoch unklar, welche Bereiche von p110  $\gamma$  eine Kernlokalisation bedingen.

Ausgehend von der Strukturanalyse der PI-3-K  $\gamma$  durch Walker und Mitarbeiter (1999) sollte mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen des p110  $\gamma$ -Wildtyps sowie der einzelnen Domänen die Lokalisation *in vivo* ohne bzw. in Anwesenheit von p101 untersucht und mögliche Domänen charakterisiert werden, die eine subzelluläre Lokalisation im Cytosol, an Membranen oder im Kern determinieren.

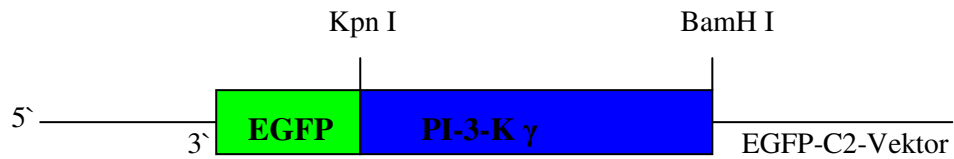
## 3 Material und Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

Grundlage für die Klonierung der N-terminal EGFP-gekoppelten Konstrukte der PI-3-K  $\gamma$  sowie ihrer Domänen war die Strukturarbeit von Walker et al. (1999). In dieser Arbeit ist erstmals die Struktur der PI-3-K  $\gamma$  dargestellt und die einzelnen Struktureinheiten beschrieben (Abb. 3B). Es handelt sich um vier Domänen (C2-Domäne, Ras-Bindungs-Domäne, helikale Domäne und Kinase-Domäne) sowie den N-Terminus (NT) der PI-3-Kinase  $\gamma$ , der keine eigentliche Protein-Domäne darstellt. Dabei umfassen die einzelnen Konstrukte den PI-3-K  $\gamma$ -WT (aa 1-1102), den N-Terminus (aa 1-219), die Ras-Bindungs-Domäne (aa 220-357), die C2-Domäne (aa 358-541), die helikale Domäne (aa 542-725) und die Kinase-Domäne (726-1102).

Mittels PCR wurden aus dem PI-3-K  $\gamma$ -cDNA-Vektor N-terminal eine KpnI Restriktionsschnittstelle und C-terminal eine BamHI Restriktionsschnittstelle im jeweiligen Konstrukt generiert, da diese Endonukleaseschnittstellen nativ nicht im PI-3-K  $\gamma$ -WT zu finden sind. Die dafür benötigten Oligonukleotide sind in Abschnitt Material und Methoden gezeigt. Danach erfolgte die Ligation der Konstrukte in den TOPO-Vektor und die anschließende Sicherung in *E. coli*. Im weiteren Verlauf wurden die TOPO-Vektoren mit den einzelnen Konstrukten wieder in *E. coli* amplifiziert und mittels alkalischer Minilyse aufgereinigt. Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau mit KpnI und BamHI, die Trennung der DNA im Agarosegel und die DNA-Aufreinigung aus dem Gel. Danach wurden die geschnittenen und aufgereinigten Konstrukte in den ebenfalls mit KpnI und BamHI verdauten EGFP-C2-Vektor ligiert (Abb. 3A). Die erzeugten EGFP-Konstrukte (Abb. 3B) wurden anschließend zur Sicherung in *E. coli* transformiert. Die Richtigkeit der einzelnen DNA-Sequenzen wurde durch Sequenzierung (JenaGen AG) bestätigt.

A



B

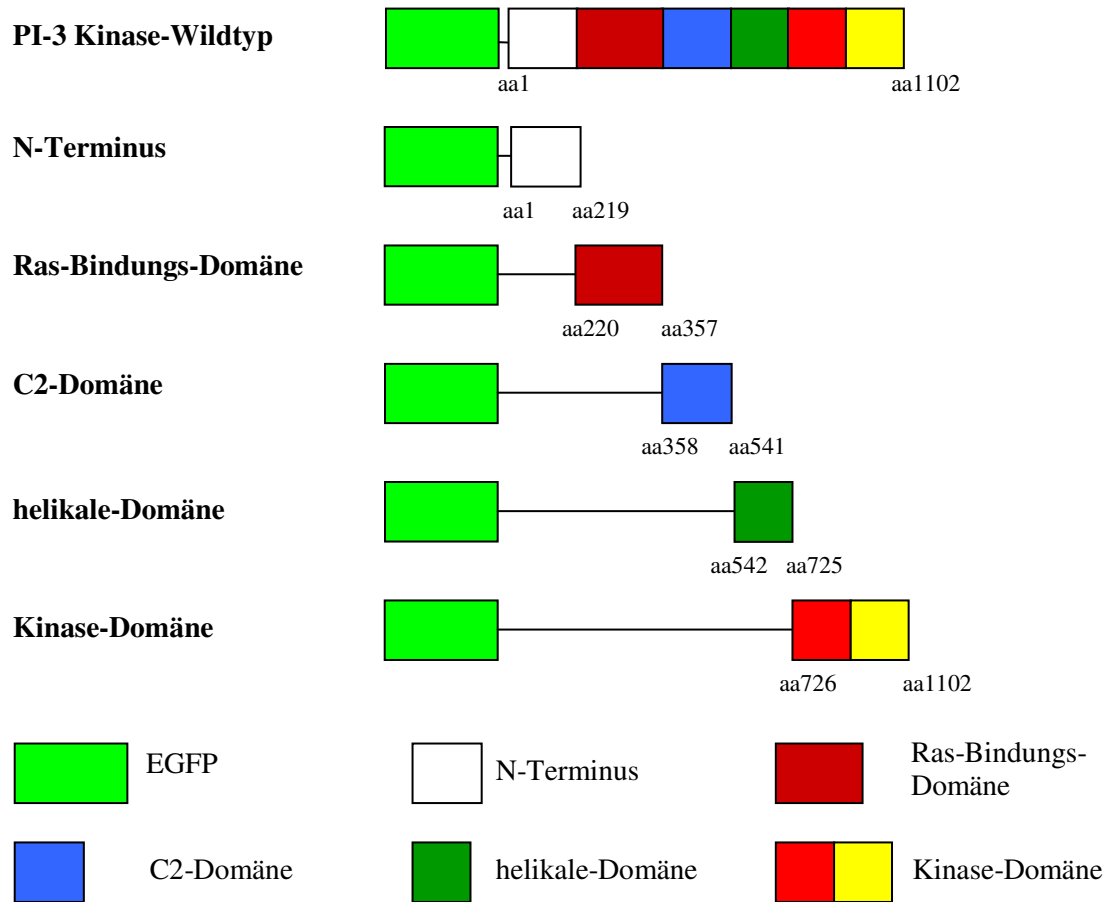


Abb. 3: Transfektionskonstrukte der Fusionsproteine aus EGFP-C2-Vektor und PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen.  
A: Klonierungsstrategie B: Transfektionskonstrukte

### 3.1.1 PCR

Zur Generierung der einzelnen Konstrukte wurde die Polymerase-Kettenreaktion nach Sambrook und Russell, 2001 genutzt. Dazu wurden in einem Eppendorfhütchen 41,3 µl deionisiertes Wasser, 5 µl PCR-Puffer, jeweils 1 µl forward- und reverse-Primer (Oligonukleotide 100 µM), 1 µl dNTP (50 mM), 0,5 µl pDNA und 0,2 µl PWO-Polymerase (1 U, Peglab) zugegeben. Der Ansatz wurde im Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm behandelt:

1. 1 min 94 °C (Startdenaturierung)
2. 30 s 94 °C (Denaturierung)
3. 30 s 50 °C (Annealing)
4. 2 min 72 °C (Elongation)
5. 29mal zurück zu 2.
6. 4 °C bis Weiterverarbeitung

Anschließend wurde dem Ansatz 1 µl Taq-Polymerase zugesetzt und für 15 min bei 72 °C inkubiert. Bei diesem Schritt wird dem PCR-Produkt am 3'-Ende eine Poly-A-Sequenz angehängen um anschließend eine Klonierung in den TOPO-Vektor zu ermöglichen.

Primer für die Amplifizierung der benötigten Konstrukte wurden vom Institut für Virulogie der FSU Jena bezogen und wurden in Tabelle 3 dargestellt.. Die Angabe der Primer-Sequenz erfolgt in 5'-3'-Richtung.



Primer	Primersequenz
WT for	GGTACCGCATGGAGCTGGAGAAC
WT rev	CTCTTTGTAAGTCGGATTACCTAGG
RBD for	GGTACCGCATCTTCATCGTCATT
RBD rev	AGGGACACCCTGACGATTACCTAGG
C2 for	GGTACCGCGACCGCAAGTTCAGG
C2 rev	CTGGGCCTTCCCCTGATTACCTAGG
Hel for	GGTACCACCGGGTTCGAGCAGAA
Hel rev	TATGACTCCCCGACACCGACCTAGG
KIDO for	GGTACCGCACAGCCATGCTGCAC
KIDO rev	CTCTTTGTAAGTCGGATTACCTAGG

Tabelle 3: Primersequenzen der einzelnen forward- und reward-Primer zur Amplifizierung der jeweiligen Proteinkonstrukte.

### 3.1.2 Klonierung der Konstrukte in TOPO-Vektor

Die Klonierung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

### 3.1.3 Agarosegelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der bei PCR oder Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte zu analytischen sowie präparativen Zwecken in Agarosegelen. Dabei wurde in 100 ml 1xTAE-Puffer 1 g Agarose aufgeschlämmt und anschließend aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugegeben und das Gel gegossen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Firma Biorad. Dazu wurden 13 µl DNA-Lösung pro Gelbahn eingesetzt. 10 µl DNA-Lösung wurden vorher mit 3 µl Bromphenolblau versetzt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 100 V für 1,5 h. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel unter eine UV-Lampe gelegt.

### 3.1.4 Gelaufreinigung

Die Reinigung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels Jetsorb (Genomed) nach den Anweisungen des Herstellers.

### 3.1.5 Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsenzyme Kpn 1 und BamH 1 von BIOLABS/USA sowie die dazu gehörigen, vom Hersteller mitgelieferten Puffer sowie Zusätze eingesetzt. Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 5 µl DNA-Lösung mit 0,5 µl (1 U) vom jeweiligen

Restriktionsenzym mit 1 µl Puffer, 0,1 µl BSA und 2,9 µl deionisierten Wasser versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.6 Ligation der Konstrukte in den EGFP-C2-Vektor**

Die Ligation von DNA wurde nach einer Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Vor der Ligation wurden die EGFP-C2-Vektor-DNA sowie die zu legierende DNA einem präparativem Restriktionsverdau unterzogen. Dann wurden in einem Eppendorfhütchen 1 µl 10x T4-Ligase-Puffer, 0,2 µl T4-Ligase (1 U, Genecraft), 0,8 µl deionisiertes Wasser sowie 8 µl Mischung aus linearisiertem EGFP-C2-Vektor und zu klonierender cDNA (molares Verhältnis Vektor zu cDNA 1:5) gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 13°C über 72 h im Thermocycler. Im Anschluss erfolgte die Kontrolle der Ligation mittels analytischem Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese.

### **3.1.7 Medien für die Bakterienkultur**

Für die Herstellung von LB-Flüssigmedium für die Bakterienkultur wurden Pepton (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l) und NaCl (5 g/l) auf 1000 ml demineralisiertes Wasser aufgefüllt, ein pH-Wert von 7,0 mittels 2 M HCL oder 2 M NaOH eingestellt und anschließend autoklaviert.

Für LB-Agarplatten (feste Medien) wird dem flüssigen LB-Medium vor dem Autoklavieren 2 g Agar-Agar pro 100 ml zugesetzt. Den jeweiligen hitzesterilisierten Medien wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml zugegeben.

### **3.1.8 Kultivierungsbedingungen**

Die *E. coli*-Zellen wurden bei 37°C kultiviert. Entweder auf LB-Agar-Platten im Brutschrank inkubiert oder bei Flüssigkulturen im Reagenzglas in LB-Flüssigmedium auf Rundschüttlern bei 200 U/min geschüttelt.

### **3.1.9 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Epicurian Coli XL1-Blue kompetente *E.coli*-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. C. Schmidt (Institut für Biochemie II, Jena) zur Verfügung gestellt.

### **3.1.10 Transformation von *E. coli***

Zum Transformieren wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA in einem Eppendorfhütchen vorsichtig vermischt. Danach erfolgte die Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde das Gemisch für 75 sec bei 42°C inkubiert und danach für 5 min auf Eis gesetzt. Nun wurden 1000 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugesetzt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine

Zentrifugation bei 2700 g über 2 min. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50 µl abgenommen und das Pellet mit dem restlichen Volumen resuspendiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C über Nacht im Brutschrank.

### **3.1.11 Animpfen von *E. coli*-Kulturen**

3 ml LB-Medium wurde in Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit 3 µl Ampicillinlösung (100mg/ml 70% Ethanol) bzw. 15 µl Kanamycinlösung (FLUKA) versetzt. Anschließend wurde ein Bakterienklon mit einem sterilen Zahnstocher von der LB-Agarplatte genommen und in das Reagenzglas gegeben bzw. 3 µl einer kultivierten *E. coli*-Lösung eingesetzt. Die Kultur wurde für 18-20 h unter Schütteln bei 37°C kultiviert.

### **3.1.12 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Alkalische Minilyse)**

Das hier verwendete Verfahren beruht auf der von Birnboim *et al.* (1979) beschriebenen Methode. Dazu wurden transformierte *E. coli*-Zellen in 3 ml LB-Medium mit Kanamycin über Nacht kultiviert und anschließend in Eppendorfhütchen bei 2700 g für 5 min abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl Lysemedium resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung wurde das Gemisch für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 150 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,9 versetzt. Nun folgte die Zentrifugation bei 20800 g für 10 min bei RT. Der Überstand wurde in 800 µl eiskaltes Isopropanol gegeben und danach für 10 min bei -20°C inkubiert. Anschließend folgte erneut eine Zentrifugation bei 20800 g für 15 min bei RT. Das Pellet wurde im Anschluss mit 600 µl 70% Ethanol versetzt und wiederum bei 20800 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 50°C getrocknet und in 40 µl deionisiertem Wasser aufgenommen.

### **3.1.13 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Alkalische Lyse)**

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren wurden Maxi-Präparationen mit dem EndoFree-Kit (Quiagen) durchgeführt. Dazu wurden 200 ml einer *E. coli*-Kultur ( $OD_{600}=2$ ) gemäß den Angaben des Herstellers aufgeschlossen. Dabei konnten 400-500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

### **3.1.14 Lagerung von Klonen**

Zur Sicherung von transformierten *E. coli*-Kulturen wurden diese zuerst als 3 ml-Flüssigkultur über Nacht kultiviert und anschließend durch Zentrifugation das Zellpellet gewonnen. Dieses wurde mit 300 µl LB-Medium und 300 µl 80% Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren.

## **3.2 Säugerzellkultur und transiente Transfektion**

### **3.2.1 HEK293-und HEK293<sub>p101</sub>-Zellkultur**

HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) und HEK293<sub>p101</sub>-Zellen (humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit p101, wurden von Herrn PD Dr. J. Müller (AG Molekulare Zellbiologie, Jena) zur Verfügung gestellt) wurden bei 37°C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in DMEM unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 0,125 % (v/v) Gentamycin kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:5 gesplittet. HEK293<sub>p101</sub>-Zellen wurde zusätzlich G418 (PAA) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml DMEM<sub>kompl</sub> beigegeben.

### **3.2.2 COS7-Zellkultur**

COS7-Zellen (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*), wurden von Herrn Prof. Dr. K.-H. Friedrich (Institut für Biochemie II, Jena) zur Verfügung gestellt) wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM unter Zusatz von 10% (v/v) fötalem Kälberserum und 0,125 % (v/v) Gentamycin kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:5 gesplittet.

### **3.2.3 NIH3T3-Zellkultur**

NIH3T3-Zellen (schweizer Mäusefibroblasten) wurden bei 37°C und 7,5 % CO<sub>2</sub> in DMEM unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 0,125 % (v/v) Gentamycin kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die adhärenenten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät oder im Verhältnis 1:5 gesplittet.

### **3.2.4 Transfektion mit METAFECTENE®**

Die transiente Transfektion von NIH3T3-, COS7- und HEK293<sub>WT</sub>- sowie HEK293<sub>p101</sub>-Zellen erfolgte mittels Lipofektion durch Metafectene (Biontex). Bei der Lipofektion wird ein Gemisch aus Lipidvesikeln (METAFECTENE®) und der zu transfizierenden DNA erzeugt. Dabei lagert sich die DNA in die Lipidvesikel ein und kann so aufgrund derer Lipophilie die Zellmembran durchdringen. In der Zelle wird die DNA in den Kern transferiert, wofür eine Zellteilung erforderlich ist, dort in mRNA transkribiert und diese anschließend translatiert. Das gewünschte Protein wird nun exprimiert. Zum Zwecke der Mikroskopie wurden die Zellen in 3 cm-Kulturschalen auf Coverslips (Durchmesser: 25 mm Stärke 1, Menzel-Gläser) ausgesetzt. Dabei wurden jeweils  $4 \times 10^5$  COS7- und HEK 293-Zellen sowie  $1 \times 10^5$  NIH 3T3-Zellen ausgesetzt. Nach 24 stündigem Wachstum erfolgte die Transfektion mit 2,5 µg Plasmid-DNA des WT und der einzelnen Konstrukte. Es wurden 10

µl Metafectene eingesetzt. Für die Co-Lokalisations-Experimente von WT bzw. RBD mit HRasV12 wurden 1 µg WT- bzw. RBD-DNA und 3 µg HRasV12-DNA eingesetzt.

Zum Zwecke der Fraktionierung und Elektronenmikroskopie wurden HEK293-Zellen in 9 cm-Kulturschalen ausgesetzt, und nach 24 h mit 12,5 µg Plasmid-DNA des WT und der einzelnen Konstrukte transfiziert. An dieser Stelle wurden 50 µl Metafectene eingesetzt.

Das Transfektionsprotokoll richtete sich nach den Angaben des Herstellers. 24 h nach Transfektion erfolgte die Mikroskopie bzw. die Zelllyse für die Fraktionierung.

### **3.2.1 Zellfraktionierung in HEK293-Zellen**

Um Aussagen über die Lokalisation der einzelnen PI-3-K  $\gamma$ -Konstrukte in der Zelle mit biochemischen Methoden zu erhalten, wurde aus transient transfizierten HEK293-Zellen jeweils die Cytosol-, Membran- und Kernfraktion gewonnen. Dazu wurden  $4 \times 10^5$  HEK293-Zellen in 6er-Wells ausgesät, nach 24 Stunden mit den PI-3-K  $\gamma$ -Konstrukten transient transfiziert und nach weiteren 24 h fraktioniert. Da nur mit transienten Transfektionen gearbeitet wurde und keine gleichen Proteinmengen der einzelnen Konstrukte in den proteinbiochemischen Analysemethoden eingesetzt wurden, sind Vergleiche der Verteilung zwischen den Fraktionen zwischen den einzelnen Konstrukten nicht möglich sondern nur für jedes Konstrukt selbst. Insgesamt kann die Methoden nur als halbquantitativ angesehen werden.

### **3.2.2 Zellernte und Fraktionierung**

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA gelöst, danach in 10 ml DMEM aufgenommen und bei 4°C und 3100 g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde jetzt in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei 4°C und 3100 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 250 µl PBS versetzt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 4°C und 3100 g für 15 min. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, erfolgte die Resuspension der Zellen in 250 µl hypotonem Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,0, 1 mM EGTA, 10 mM Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 2 mM Natriumorthovanadat, 2 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µM Pepstatin). Anschließend wurden die Zellen 8 mal für 30 sec in Eiswasser ultrabeschallt mit jeweils 1 min Pause. Die Kontrolle der suffizienten Zelllyse erfolgte anschließend mittels Trypanblau-Färbung eines 50 µl Aliquots und mikroskopischer Kontrolle.

Nun wurde das Zelllysate bei 4°C und 3100 g für 15 min zentrifugiert und so die Kernfraktion gewonnen. Aus dem Überstand wurden 200 µl in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und bei 4°C und 135000 g für 1,5 h ultrazentrifugiert (Sorval). Der Überstand (Cytosol) wurde abgenommen und in ein Eppendorf-Hütchen überführt. Das Sediment (Membranfraktion) ebenso wie die Kernfraktion wurden in ihrem Ursprungsvolumen Triton-Puffer aufgenommen und noch 3 mal für 30 sec ultrabeschallt. Die Ultrabeschallung erfolgte ggf. so lange bis keine Kern- bzw. Membranpartikel mehr zu sehen waren.

Nun wurden jeweils 0,5 µl der jeweiligen Fraktion für den LDH-Test und PI-4-Kinase-Test abgenommen. Das restliche Volumen wurde mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend 5 min bei 95°C desintegriert. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

### **3.3 Proteinbiochemische Analysemethoden**

#### **3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickelte SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Den zu trennenden Proteinproben wird im Probenpuffer  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, wodurch Disulfidbrücken gespalten werden. Durch SDS wird das Protein zum einen denaturiert, d.h. alle nicht kovalenten Bindungen werden zerstört, zum anderen stark negativ geladen, so dass eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molmasse unabhängig von Faltung und Ladung möglich wird. Zur Konzentrierung der Proteine wurde ein großporiges 8 % Sammelgel und ein kleinporiges 10 % Trenngel verwendet. Eine Darstellung der Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel findet sich in Tabelle 4. Die mit Laemmli-Puffer (6 % SDS, 15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau, 187 mM Tris/HCl, pH 6,8) versetzten Proben wurden 5 min bei 100 °C hitzedenaturiert und anschließend in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurden Proteinstandards mitgeführt.

Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte im Tris-Glycin-SDS-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS) bei einer Spannung von 200 V. Es wurde eine Mini Protean Elektrophorese-Apparatur von BioRad verwendet.

	8 % Sammelgel	10 % Trenngel
Acrylamid-Lösg.	4 ml	5 ml
1M Tris pH 8,8	5,6 ml	5,6 ml
Wasser	5,35 ml	4,35 ml
20% SDS	75 µl	75 µl
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl

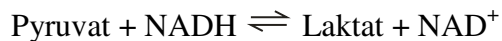
Tabelle 4: Zusammensetzung des 10 %igen Trenn- und des 8 %igen Sammelgels für jeweils 4 Gele.

### 3.3.2 Western-Blot und Immundetektion

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden mit einer Semidry-Blotapparatur (BioRad) mit Blot-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) über 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham) übertragen. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit 0,3 % (v/v) schwarzer Tinte (Pelikan) für 15 min inkubiert, um so die Proteine einschließlich der Proteinmarker anzufärben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in 5 % (m/v) Milchpulver- PBS-TWEEN für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln. Die Milchproteine dienen der Absättigung freier Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran. Danach wurde in einer Verdünnung von 1:8000 monoklonaler Anti-EGFP-Antikörper (BD Biosciences Clontech) zugegeben und über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde die Nitrozellulose-Membran 6 mal für je 5 min mit PBS-TWEEN gewaschen und anschließend wurde Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:5000 zugegeben und für eine Stunde unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde abermals 6 mal für je 5 min mit PBS-TWEEN gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte der Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe durch Chemolumineszenz (ECL-Kit, Amersham).

### 3.3.3 LDH-Test

Der LDH-Test beruht auf der enzymatischen Umwandlung von Pyruvat in Laktat unter Umsatz von NADH. Das dabei entstehende  $\text{NAD}^+$  besitzt bei 340 nm keine Absorbanz, so dass bei Substratüberschuß die Abnahme der Extinktion proportional der Laktatdehydrogenaseaktivität ist.



Pipettieren des Ansatzes in einer Messküvette

Ansatz:	600µl	0,1M Na-Phosphat-Puffer pH 7,0
	20µl	14mM NADH
	330µl	PBS
	0,5µl	Probe
	50µl	23mM Pyruvat

Die 50 µl Pyruvat werden zuletzt zugeben und so die Reaktion gestartet. Die Messung erfolgt mit Hilfe eines Photometers bei 340 nm über einen Zeitraum von 5 min.

### 3.3.4 PI-4-Kinase-Test

50 µl Probe werden zu 50 µl PI-Lösung (,63 mM PI in 50 mM Tris / HCL pH = 7,2) und 25 µl TME (3 % Triton X-100, 60 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM EGTA in 50 mM TRIS pH = 7,2) pipettiert. Dann wird durch Zugabe von 25 µl ATP-Lösung (2,5 mM ATP in 125 mM TRIS / 125 mM KCL pH = 7,2 mit 1 µCi ATP- $\gamma$ -32P pro Ansatz) der Test gestartet. Anschließend erfolgt die Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten. Durch Zugabe von 1,2 ml Stopplösung (pro Ansatz 1 ml Hexan / Isopropanol (26:14) und 0,2 ml HCL (conz.) / 2 N KCL (0,25:8)) zu jedem Reaktionsgefäß wird die Inkubation beendet. Dann werden die Ansätze gut geschüttelt und bis zur vollständigen Phasentrennung stehengelassen. Von der oberen organischen Phase werden jeweils 0,5 ml abgenommen und zu 0,5 ml 0,1 N HCL gegeben. Danach werden die Gefäße wieder gut geschüttelt und zur Phasentrennung stehengelassen. Jeweils 0,2 ml der oberen organischen Phase werden in 2 ml Szintillationscocktail pipettiert. Die Proben werden dann im Szintillationsmeßgerät (Tricarb 2700TR Canberra Packard) gemessen.



### **3.4 Mikroskopische Untersuchungen**

#### **3.4.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Die fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der zellulären Lokalisation der jeweiligen transfizierten Konstrukte erfolgte mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) Die Deckgläser, auf denen die transfizierten Zellen ausgesät wurden, wurden in eine hierfür angefertigte Messkammer eingespannt und mit 1 ml PBS-Puffer bedeckt. Alle Messungen erfolgten mit einem C-Apochromat 63x (NA 1,20) Objektiv. EGFP-Fluoreszenz wurde mit der 488 nm Linie eines Argon-Lasers angeregt. Die vom Präparat emittierte und vom Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht wurde mit einem 488 Hauptfarbteiler vom Anregungslicht getrennt und mit einem 505 nm Langpassfilter gefiltert. Die Fluoreszenzanregung der DsRed-HRasV12-Konstrukte und Draq5-gefärbten Zellen erfolgte bei 543 nm. Fluoreszenzlicht wurde mit einem 488/543 Hauptfarbteiler vom Anregungslicht getrennt und mit einem 560 nm Langpass Filter aufgenommen. Co-Lokalisationsmessungen mit EGFP wurden zur Vermeidung von cross-talk zwischen den Kanälen im multi-track-Verfahren (gleichzeitige Anregung von zwei verschiedenen Fluorophoren mit Trennung des emmitierten Signals unter Verwendung verschiedener Filter) mit sequentieller Anregung bei 488 nm und 543 nm unter Verwendung eines 505-530 nm Bandpassfilter und 560 nm Langpassfilter durchgeführt. Die Messungen wurden mittels der ZEISS LSM510-Software ausgewertet. Die Nachbearbeitung (Beschriftung, Kontrasteinstellung) und Archivierung erfolgte durch den ZEISS LSM Image Browser.

#### **3.4.2 Gefrierbruch-Immunmarkierung SDS-FRL (SDS-digested freeze-fracture replica labeling)**

Im Gefrierbruch-Immunmarkierungs-Verfahren (SDS-FRL) werden unfixierte Zellen zunächst schockgefroren. Dann erfolgt der Gefrierbruch, der bevorzugt in der hydrophoben Region der Membranen erfolgt. Die erzeugten Membran-Spaltflächen werden durch Platin/Kohlenstoff-Bedampfung stabilisiert und somit repliziert. In der Replika-Schicht bleiben die Proteine und Lipide der jeweiligen Halbmembran haften, diese sind nach einer SDS-Behandlung, in der alle nicht Replika-gebundene Zellzeste abgelöst werden, zugänglich für Immunmarkierung. So ist es möglich die 2-dimensionale Verteilung von z.B. Proteinen oder Lipiden nach cytochemischer Markierung an der Plasmamembran elektronenmikroskopisch darzustellen.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Experimente mittels SDS-FRL wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. M. Westermann (Elektronenmikroskopisches Zentrum, Jena) durchgeführt. Die in 9 cm Kulturschalen ausgesäten und nach obigen Angaben (3.2.2.4)

transfizierten Konstrukte wurden gemäß der SDS-FRL-Methode behandelt und anschließend im TEM (EM 902 A Elektronenmikroskop, Zeiss) untersucht. Eine genaue Beschreibung der SDS-FRL-Methode findet sich bei Fujimoto (1997).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Lokalisation von PI-3-K $\gamma$ und ihrer Domänen durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -WT und seiner Domänen *in vivo* wurde der EGFP-Vektor oder die jeweiligen Transfektionskonstrukte in Säugerzellen transient transfiziert und nach 24 Stunden mit einem konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) untersucht.

Zur Überprüfung von Zelllinien-spezifischen Effekten erfolgte die Analyse der Lokalisation in drei verschiedenen Zelllinien: HEK 293-, COS7- und NIH 3T3-Zellen.

Die Untersuchung einer möglichen Rolle der p101-Untereinheit auf die subzelluläre Verteilung der PI-3-K  $\gamma$  und seiner Domänen erfolgte mit Hilfe von stabil mit p101 transfizierten HEK 293-Zellen (HEK293<sub>p101</sub>). Diese Zellen wurden ebenfalls mit den EGFP-Fusionskonstrukten transient transfiziert und nach 24 Stunden mittels CLSM analysiert.

#### 4.1.1 Lokalisation des nicht fusionierten EGFPs

Bei der mikroskopischen Untersuchung der drei Zelllinien HEK 293, COS7 und NIH 3T3, die mit der EGFP-Kontrolle (leerer EGFP-Vektor) transfiziert wurden, zeigte sich eine etwa gleichstarke Verteilung des EGFP-Proteins zwischen Zytosol und Zellkern in HEK 293- und NIH 3T3-Zellen. In Cos7 Zellen ist eine leicht stärkere Kernfluoreszenz zu sehen. In den Nukleoli ist keine Fluoreszenz zu finden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

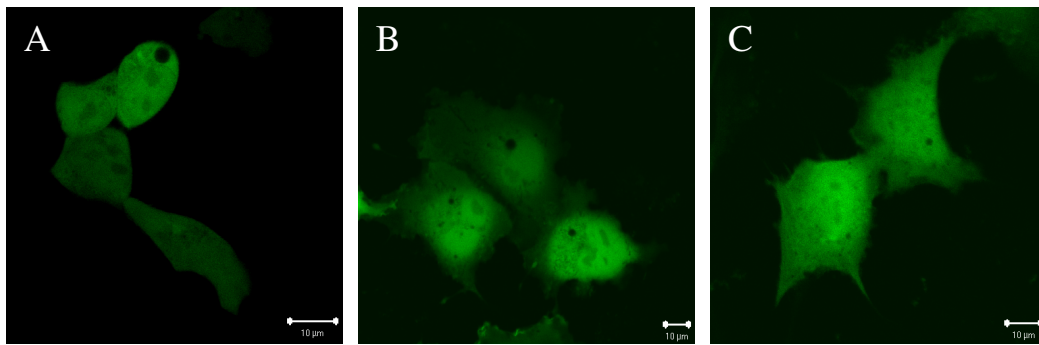


Abb. 5: Subzelluläre Verteilung des nicht fusionierten EGFPs

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in **A** HEK293-Zellen, **B** COS 7-Zellen und **C** NIH 3T3-Zellen. EGFP ist in HEK293- und NIH 3T3-Zellen zwischen Cytosol und Kern annähernd gleich verteilt. In Cos 7-Zellen erscheint der vorwölbte Kern stärker gefärbt. Balken: 10µm.

#### 4.1.2 Lokalisation einer konstitutiv membranbindenden inaktiven PI-3-K $\gamma$ -CAAX - Mutante (CAAX)

Um eine Plasmamembranbindung der PI-3-K  $\gamma$  bzw. ihrer Domänen in den verwendeten Systemen zu untersuchen, wurde in allen drei Zelllinien eine inaktive membranbindende Variante der PI-3-K  $\gamma$  transfiziert (PI-3-K  $\gamma$ -CAAX). Diese bindet über einen C-terminalen Lipid-Anker an die Plasmamembran und sollte so als Positivkontrolle einer Plasmembrananreicherung von p110  $\gamma$  bzw. der Domänen dienen. Mikroskopisch stellt sich die CAAX-Mutante in allen drei Zelllinien als vorrangig plasmamembrangebunden dar (Abb. 6). Der zytosolische Anteil ist gering, ebenso das Fluoreszenzsignal im Kern. In der mikroskopischen Untersuchung fällt ein qualitativer Unterschied in der Plasmamembranbindung zwischen den Zelllinien auf. So stellen sich die Zellgrenzen in den HEK 293-Zellen als sehr glatt und gleichmäßig dar, wohingegen die Plasmamembran in den COS7- und NIH 3T3-Zellen unregelmäßig konturiert mit einzelnen Signalanreicherungen erscheint. Auffällig ist weiterhin eine fehlende oder nur sehr schwache Bindung an die Kernmembran.

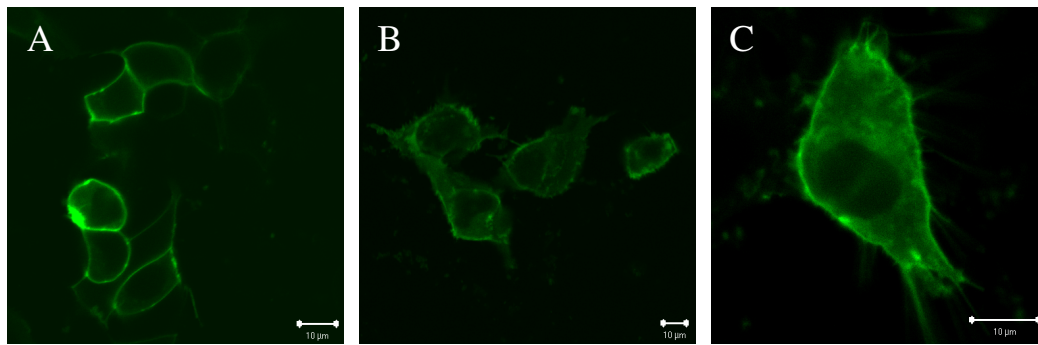


Abb. 6: Subzelluläre Verteilung der inaktiven PI-3-K  $\gamma$ -CAAX-Mutante  
 Konfokale Aufnahmen der CAAX-Mutante in HEK 293-Zellen **A** COS 7-Zellen **B** und in NIH 3T3-Zellen **C**. Die Mutante bindet über einen C-terminalen Lipid-Anker an die Plasmamembran. Dementsprechend ist die von der Plasmamembran stammende Fluoreszenz stark, während Kern und Cytosol nur schwach markiert sind. Balken: 10  $\mu$ m

#### 4.1.3 Lokalisation des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps (WT)

Nach Expression des Wildtyp-Konstruktes zeigt sich ein in den drei Zelllinien vergleichbares Verteilungsbild des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps, bei der die Fluoreszenz hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb 7). Die Zellkerne weisen ein schwaches, die Nukleoli kein Fluoreszenzsignal auf. In der Plasmamembran läßt sich in Relation zum Zytoplasma keine Anreicherung des Proteins feststellen.

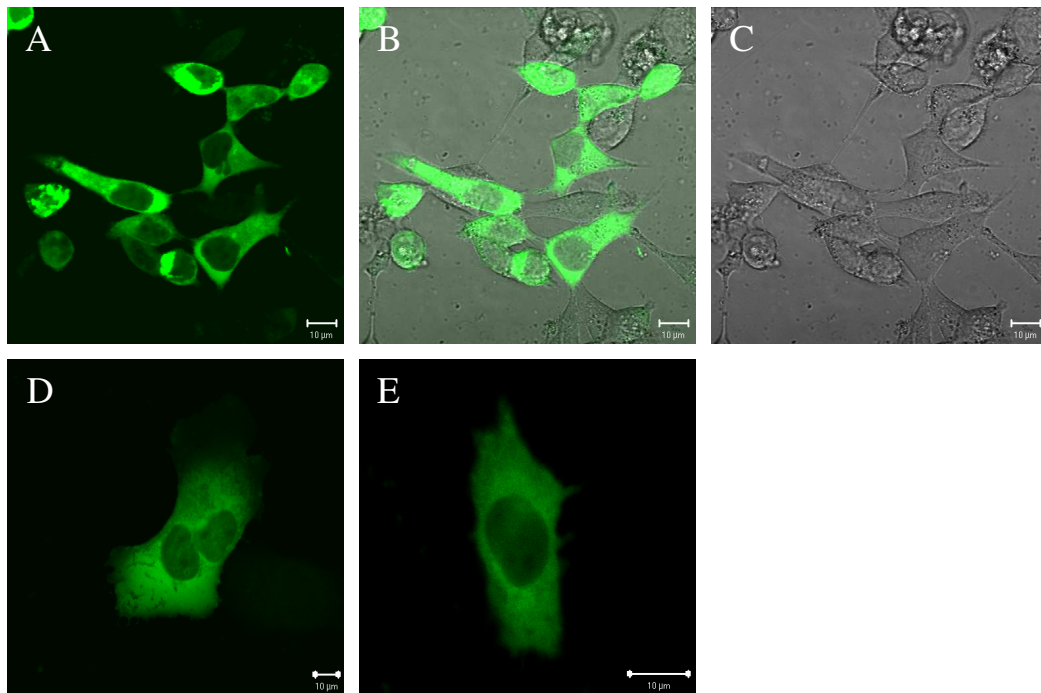


Abb. 7: Subzelluläre Verteilung des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps in HEK 293-Zellen

**A-C** Subzelluläre Verteilung nach Expression in HEK 293-Zellen **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild **C** Transmissionsbild. **D** Fluoreszenzbild nach Expression in COS 7-Zellen **E** Fluoreszenzbild nach expression in NIH 3T3-Zellen. In allen Zelllinien ist der PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyp hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Zellkerne weisen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal auf. (Balken: 10 $\mu$ m)

Nach Transfektion des WT in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen zeigte sich auch hier ein primär cytosolisches Verteilungsbild des Proteins. Die Kerne weisen ein schwaches Fluoreszenzsignal auf. Intrazelluläre Organellen sind ebenfalls von der Färbung ausgespart und gut darstellbar. Insgesamt ist festzustellen, dass p101 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des WT hat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

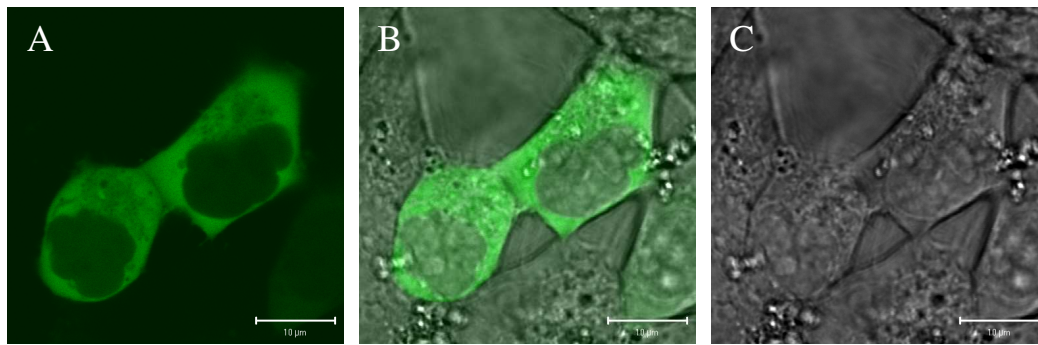


Abb. 8: Subzelluläre Verteilung des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps in HEK 293p101-Zellen

Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation des p110  $\gamma$ -WT in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10  $\mu$ m

#### 4.1.4 Lokalisation des N-Terminus der PI-3-K $\gamma$

*In vitro* Untersuchungen zur Bindung der PI-3-K  $\gamma$  an Phospholipidvesikel ließen die Vermutung zu, dass der N-terminale Teil des Proteins (Aa 37-773, dieser beinhaltet N-Terminus, RBD, C2-Domäne, helikale Domäne und einen Teil der Kinase-Domäne.) maßgeblich an der Vermittlung der Protein-Lipid-Bindung durch zunächst hydrostatische Wechselwirkung und anschließender hydrophober Bindung beteiligt ist (Kirsch et al. 2001). Deshalb sollte die subzelluläre Lokalisation des N-Terminus der PI-3-K  $\gamma$  (aa 1-219) und eine mögliche Beteiligung an der Plasmamembranbindung *in vivo* genauer untersucht werden.

Nach Expression in HEK293-, COS7- und NIH3T3-Zellen ist eine überwiegende Lokalisation des N-Terminus im Zellkern unter deutlicher Aussparung der Nukleoli feststellbar (Abb. 9). Das Zytoplasma erweist sich als wenig signalintensiv.

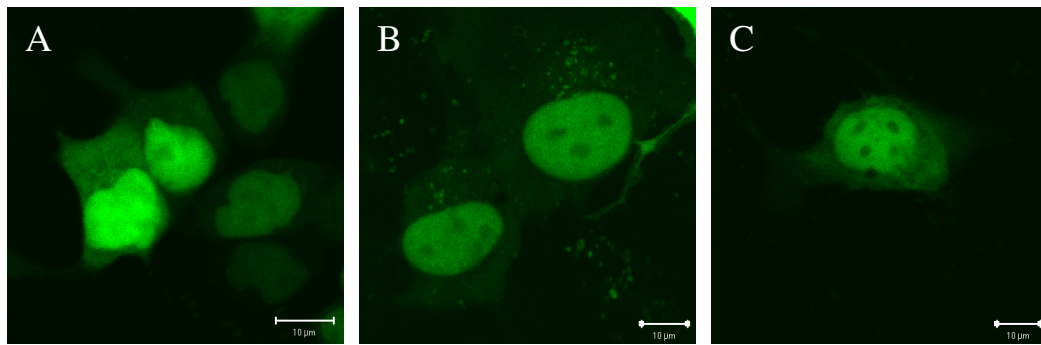


Abb. 9: Subzelluläre Verteilung des N-Terminus

**A** Fluoreszenzaufnahme nach Expression des N-Terminus in HEK 293-Zellen, **B** Fluoreszenz in COS7-Zellen **C** Fluoreszenz in NIH 3T3-Zellen. In allen Zelllinien ist die Fluoreszenz hauptsächlich im Kern lokalisiert. Balken: 10 µm

Die Expression des NT-Fusionsproteins in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen erbrachte ebenfalls eine vorwiegend nukleäre Lokalisation mit schwacher zytosolischer Fluoreszenz (Abb. 10). So kann man feststellen, dass die p101-Untereinheit keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von NT hat.

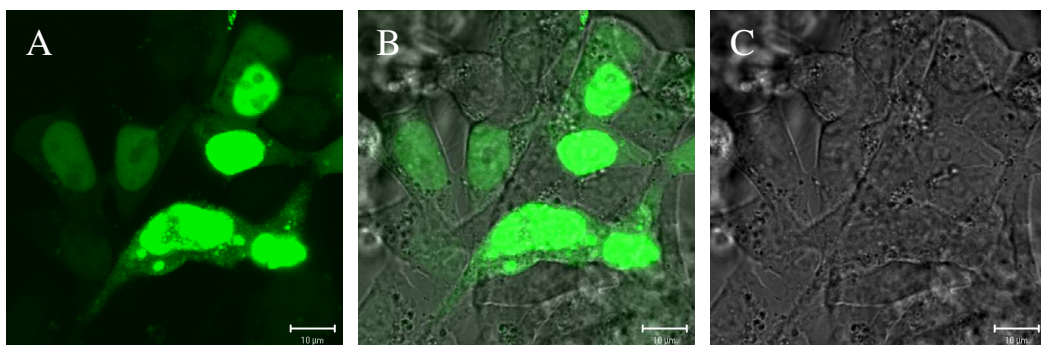


Abb. 10: Subzelluläre Verteilung des N-Terminus in HEK 293p101-Zellen

Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation des N-Terminus in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10 µm

#### 4.1.5 Lokalisation der Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-K $\gamma$

Die Ras-Bindungs-Domäne (RBD) zeigt nach Expression in den drei Zelllinien eine vornehmlich cytoplasmatische Verteilung (Abb. 11). Auffällig ist das Auftreten von intrazellulären cytoplasmatischen Protein-Aggregaten in einigen Zellen. Die Kerne zeigen ein schwaches Fluoreszenzsignal mit freien Nukleoli.



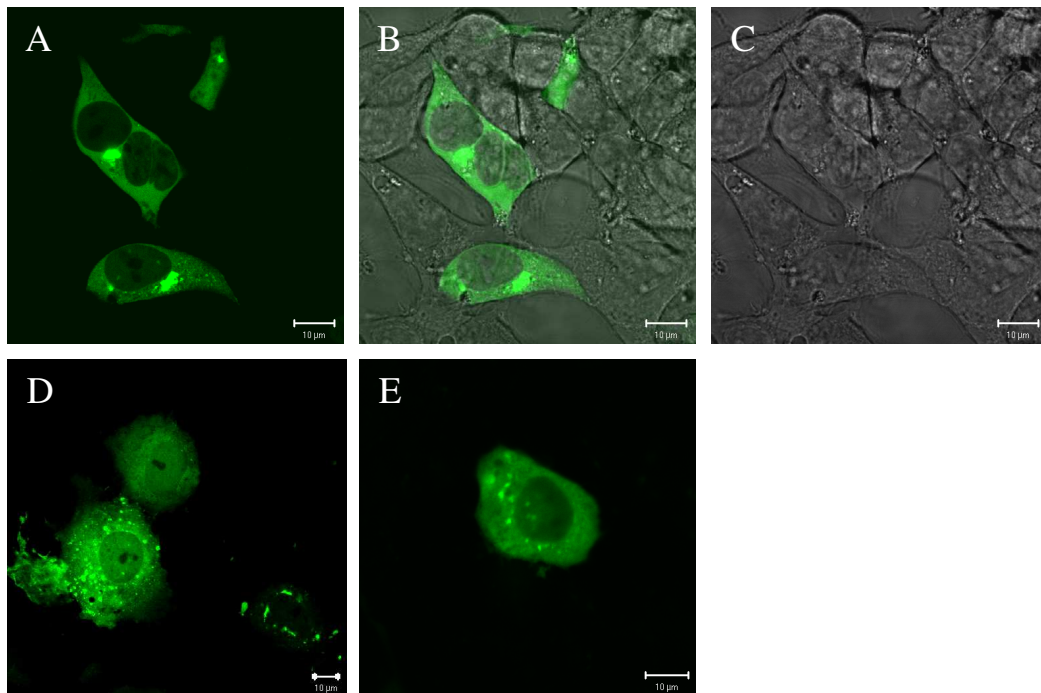


Abb. 11: Subzelluläre Verteilung der Ras-Bindungs-Domäne

**A-C** Subzelluläre Verteilung nach Expression in HEK 293-Zellen **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild **C** Transmissionsbild. **D** Fluoreszenzbild nach Expression in COS 7-Zellen **E** Fluoreszenzbild nach Expression in NIH 3T3-Zellen. In allen Zelllinien ist Ras-Bindungs-Domäne hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Zellkerne weisen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal auf. Balken: 10 µm

Auch unter Einfluss von p101 ändert sich nichts am zellulären Verteilungsmuster der RBD im fluoreszenzmikroskopischen Bild. So erscheint nach Expression von RBD in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen der überwiegende Anteil des Signals im Cytoplasma (Abb. 12). Ein kleiner Teil von RBD befindet sich im Kern bei freien Nukleoli. Die Bildung von cytoplasmatischen Protein-Aggregaten konnte auch nach Expression unter p101 beobachtet werden (Bilder hier nicht gezeigt), was darauf hinweist, dass p101 die unspezifische Aggregation von RBD nicht verhindern kann.

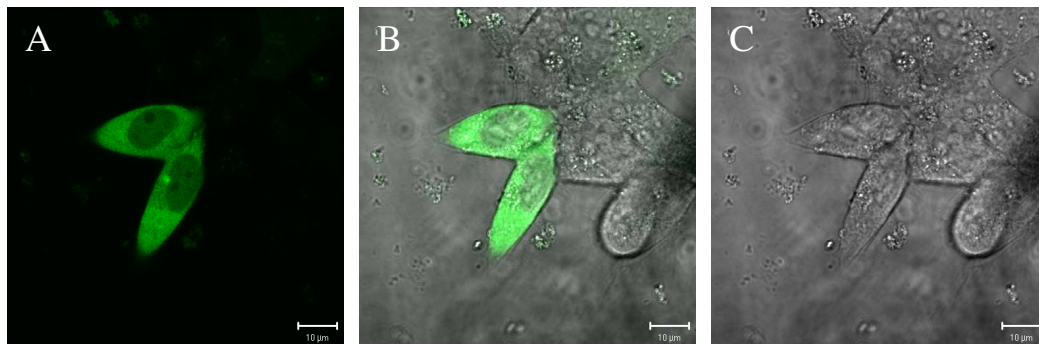


Abb. 12: Subzelluläre Verteilung der Ras-Bindungs-Domäne mit p101  
Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation der RBD in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10 µm

#### 4.1.6 Lokalisation des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps und der Ras-Bindungs-Domäne unter dem Einfluss von H-RasV12

Nach Co-Expression des EGFP-gekoppelten PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps und der konstitutiv aktiven DsRed-gekoppelten Ras-Mutante H-RasV12 in HEK 293-Zellen konnte keine Co-Lokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps mit H-RasV12 festgestellt werden. Abb. 13 zeigt die cytoplasmatische Verteilung des Wildtyps (Abb. 13 A) und die Membranlokalisation von H-RasV12 (Abb. 13B). Bei der gleichzeitigen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zeigt sich keine Überlagerung der jeweiligen Farbkanäle. Beide Fluoreszenzsignale lassen sich gut voneinander trennen (Abb. 13C).

Nach Expression der EGFP-gekoppelten Ras-Bindungs-Domäne mit H-RasV12 findet sich eine schwache Anreicherung der RBD an der Plasmamembran in Form eines schmalen Signalsaumes und punktueller Signalanhebung (Abb. 14A). Für H-RasV12 findet sich eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abb. 14B). Bei gleichzeitiger Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe zeigt sich eine Co-Lokalisation von EGFP und DsRed in Form eines hellgrünen bis gelblichen Farbtones (Abb. 14C).

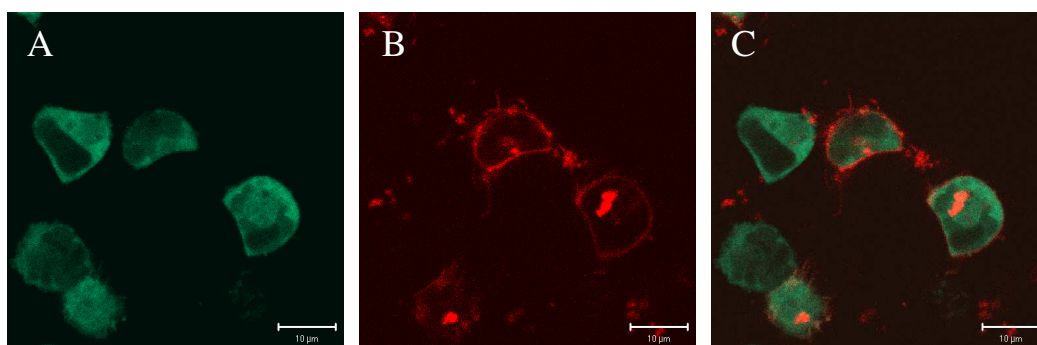


Abb. 13: Co-Expression des EGFP-PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps und DsRed-H-RasV12

Die Aufnahmen zeigen die Co-Expression des EGFP-PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps und DsRed-H-RasV12. **A** vorwiegend cytosolische Lokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps nach selektiver Anregung von EGFP, **B** Lokalisation in der Plasmamembran von H-RasV12 nach selektiver Anregung von DsRed **C** Lokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps und H-RasV12 bei gleichzeitiger Anregung beider Fluoreszenzfarbstoffe. Balken: 10  $\mu$ m

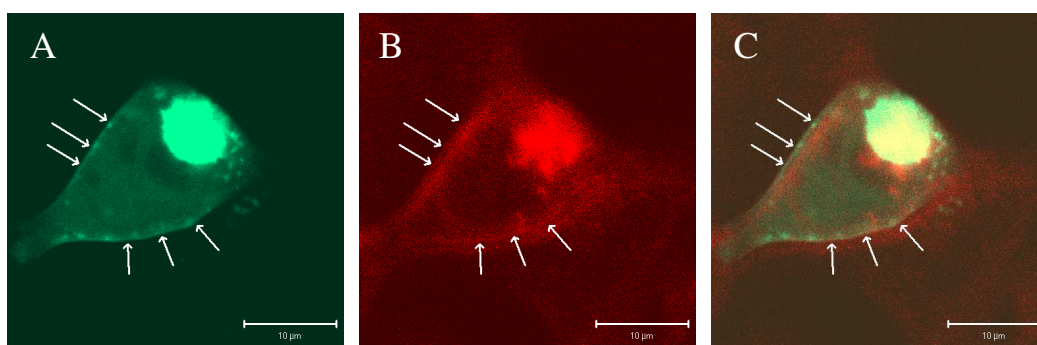


Abb. 14: Co-Expression der EGFP-gekoppelten Ras-Bindungs-Domäne und DsRed-H-RasV12

Die Aufnahmen zeigen die Co-Expression der EGFP-RBD und DsRed-H-RasV12. **A** schwache Anreicherung der EGFP-RBD in der Plasmamembran nach selektiver Anregung von EGFP, **B** Lokalisation in der Plasmamembran von H-RasV12 nach selektiver Anregung von DsRed **C** Lokalisation der EGFP-RBD und H-RasV12 bei gleichzeitiger Anregung beider Fluoreszenzfarbstoffe. Balken: 10  $\mu$ m

#### 4.1.7 Lokalisation der C2-Domäne der PI-3-K $\gamma$

Die C2-Domäne stellt sich nach Expression in allen drei Zelllinien vornehmlich im Kern lokalisiert mit freien Nukleoli dar. Das Zytoplasma erscheint in HEK 293-Zellen als gleich signalintensiv wie der Kern. In COS7- und NIH 3T3-Zellen hingegen ist die Fluoreszenzstärke des Zytoplasmas gegenüber dem Kern abgeschwächt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

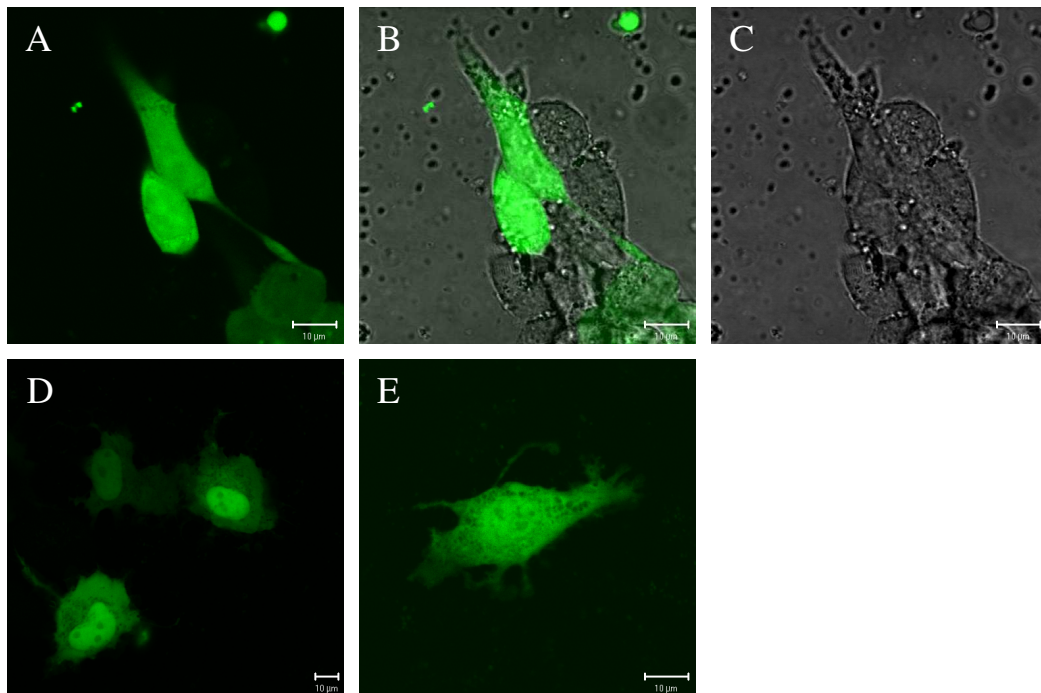


Abb. 15: Subzelluläre Verteilung der C2-Domäne

**A-C** Subzelluläre Verteilung nach Expression in HEK 293-Zellen **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild **C** Transmissionsbild. **D** Fluoreszenzbild nach Expression in COS 7-Zellen **E** Fluoreszenzbild nach Expression in NIH 3T3-Zellen. Balken: 10 µm

Nach Expression der C2-Domäne mit p101 in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen kann keine Änderung der subzellulären Lokalisation gegenüber der Expression ohne p101 nachgewiesen werden. So ist auch unter p101 die C2-Domäne im Kern sowie im Cytosol verteilt zu finden (Abb. 16). Auffällig sind wiederum die gut abgrenzbaren signalarmen Nukleoli und Kerngrenzen.

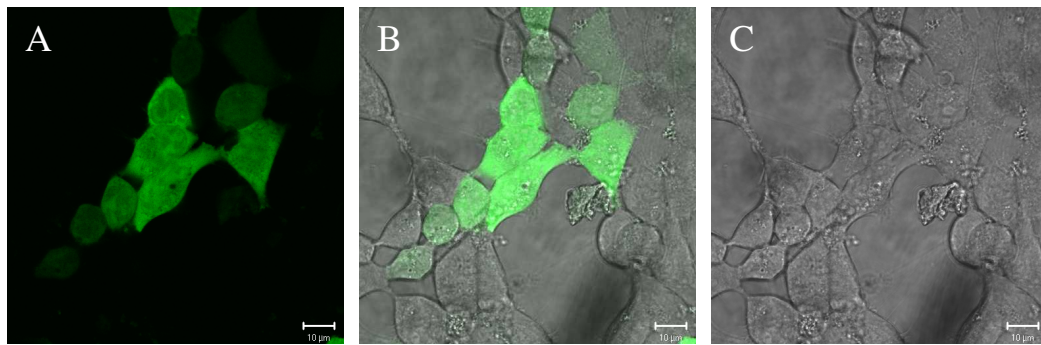


Abb. 16: Subzellulären Verteilung der C2-Domäne mit p101

Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation der C2-Domäne in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10  $\mu$ m

#### 4.1.8 Lokalisation der helikalen Domäne der PI-3-K $\gamma$

Die helikale Domäne ist in HEK 293-, COS7- sowie NIH 3T3-Zellen vornehmlich im Zellkern unter Aussparung der Nukleoli lokalisiert (Abb. 17). Das Zytoplasma erscheint nur sehr schwach gefärbt. Eine Anreicherung in der Plasmamembran ist nicht festzustellen. Zu erwähnen ist die im Vergleich zu den anderen Domänen geringe Transfektionsrate dieses Konstruktes. Besonders in NIH 3T3-Zellen ließen sich nur wenig transfizierte Zellen auffindig machen.



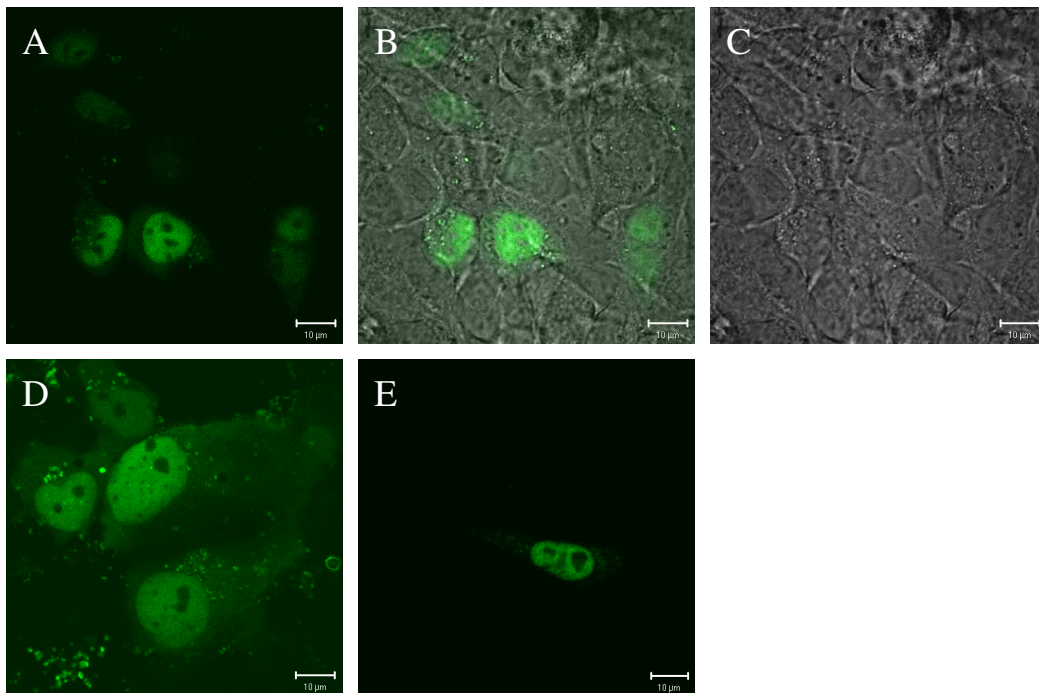


Abb. 17: Subzelluläre Verteilung der helikalen Domäne

**A-C** Subzelluläre Verteilung nach Expression in HEK 293-Zellen **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild **C** Transmissionsbild. **D** Fluoreszenzbild nach Expression in COS 7-Zellen **E** Fluoreszenzbild nach Expression in NIH 3T3-Zellen. Balken: 10 µm

Nach Expression der helikalen Domäne mit der regulatorischen p101-Untereinheit in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen findet sich ebenfalls eine überwiegende Lokalisation im Zellkern mit freien Nukleoli sowie ein schwaches zytosolisches Fluoreszenzsignal, wie in Abbildung 18 wiedergegeben.

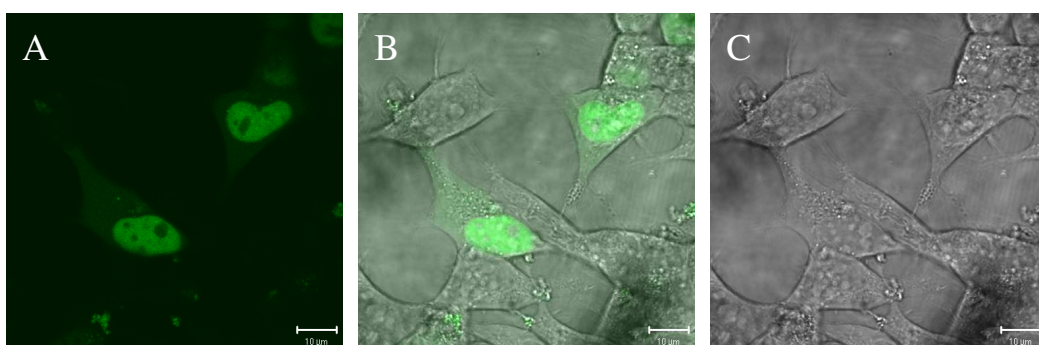


Abb. 18: Subzelluläre Verteilung der helikalen Domäne mit p101

Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation der Helikalen Domäne in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10 µm

#### 4.1.9 Lokalisation der Kinase-Domäne der PI-3-K $\gamma$

Die Kinase-Domäne zeigt in allen drei Zelllinien eine weitgehende cytoplasmatische Verteilung unter Aussparung des Fluoreszenzsignals im Bereich von intrazellulären

Organellensrukturen (Abb 19). Der Kern ist nur sehr schwach gefärbt, was man besonders gut in den COS7- und NIH 3T3-Zellen erkennen kann.

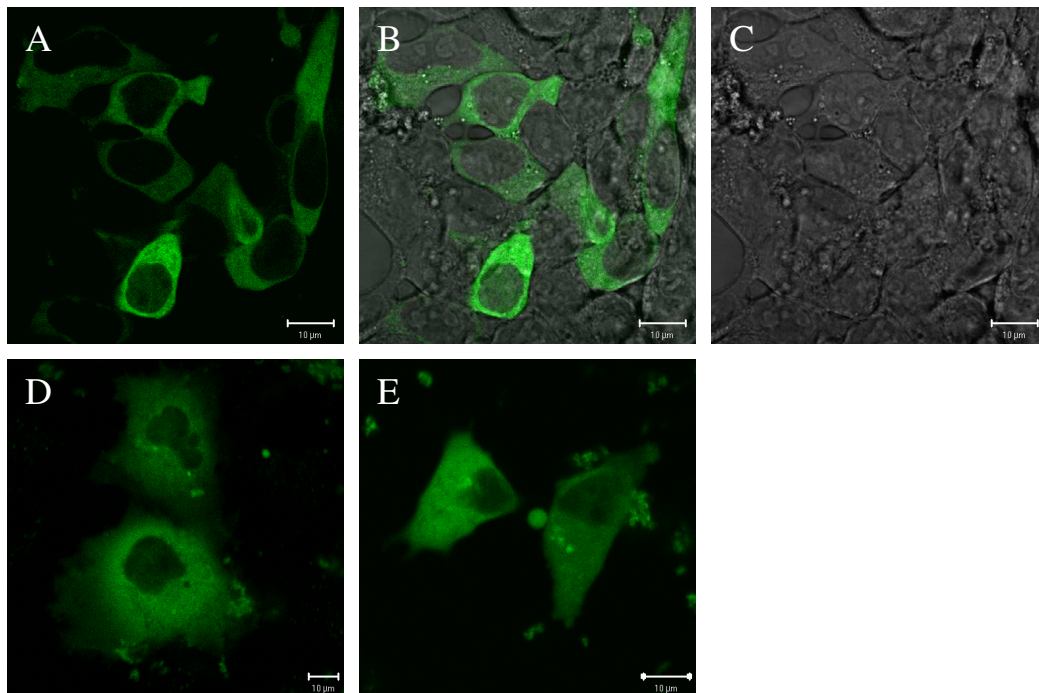


Abb. 19: Subzelluläre Verteilung der EGFP markierten Kinase-Domäne

**A-C** Subzelluläre Verteilung nach Expression in HEK 293-Zellen **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild **C** Transmissionsbild. **D** Fluoreszenzbild nach Expression in COS 7-Zellen **E** Fluoreszenzbild nach Expression in NIH 3T3-Zellen. Balken: 10 µm

In HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen zeigt sich kein Unterschied in der subzellulären Verteilung der Kinase-Domäne (Abb. 20). So findet sich die Kinase-Domäne wiederum vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert unter Aussparung von intrazellulären Organellen und schwacher Anfärbung des Zellkerns.

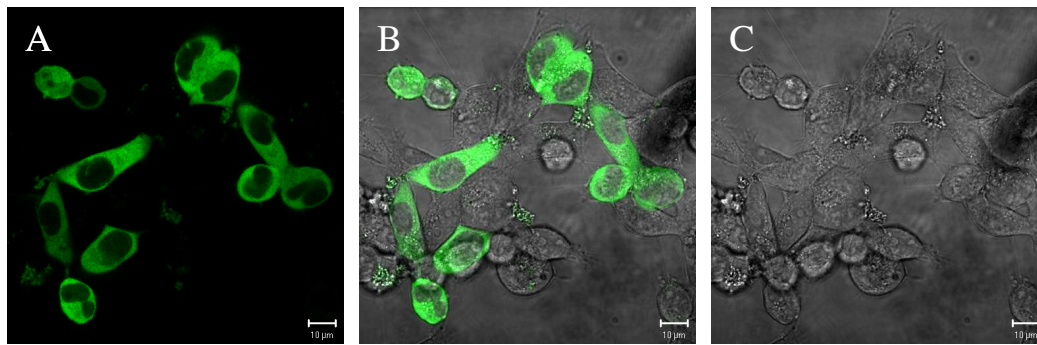


Abb. 20: Subzelluläre Verteilung der Kinase-Domäne mit p101

Die Aufnahmen zeigen die Lokalisation der Kinase-Domäne in Anwesenheit von p101. **A** Fluoreszenzbild, **B** Überlagerung von Fluoreszenz- und Transmissionsbild, **C** Transmissionsbild. Balken: 10  $\mu\text{m}$

## 4.2 Untersuchung der zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen mittels Gefrierbruch-Immunmarkierung (SDS-FRL)

### 4.2.1 Untersuchung der Plasmamembranbindung der PI-3-K $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen

In den bisherigen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  konnte kein Nachweis einer Plasmamembranbindung des Wildtyp-Enzyms sowie seiner Domänen erbracht werden. Da aber in stimulierten wie auch in unstimulierten Zellen in Zellfraktionierungsexperimenten eine Membranassoziation der PI-3-Kinase  $\gamma$  nachgewiesen wurde, erschien die Methode der Fluoreszenzmikroskopie für diese Fragestellung nicht ausreichend. Es sollte daher mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden, ob sich überexprimierte EGFP-gekoppelte PI-3-K  $\gamma$  an der Plasmamembran von HEK 293-Zellen gebunden findet. Dazu wurde das Wildtyp-Enzym transient in HEK 293-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden elektronenmikroskopisch untersucht. Zum Vergleich wurden die Plasmamembran-bindende CAAX-Mutante als Positivkontrolle sowie EGFP als Negativkontrolle mitgeführt. Die genaue Beschreibung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen mittels SDS-FRL findet sich in Material und Methoden.

Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plasmamembranbindung des Wildtyps, der EGFP-Kontrolle und der CAAX-Mutante sind in Abb. 21 wiedergegeben. In der Gefrierbruch-Untersuchung läßt sich eine Bindung des Wildtyp-Enzym an die Plasmamembran nachweisen (Abb. 21A). Das Enzym ist in kleinen Gruppen oder punktuell verstreut in der Plasmamembran lokalisiert. Die CAAX-Mutante zeigt sich in Form von zahlreichen dicht gruppierten Signalspots an die Plasmamembran gebunden (Abb. 21C). Für EGFP finden sich nur sehr wenige, vereinzelte punktuelle Signalspots (Abb. 21B).



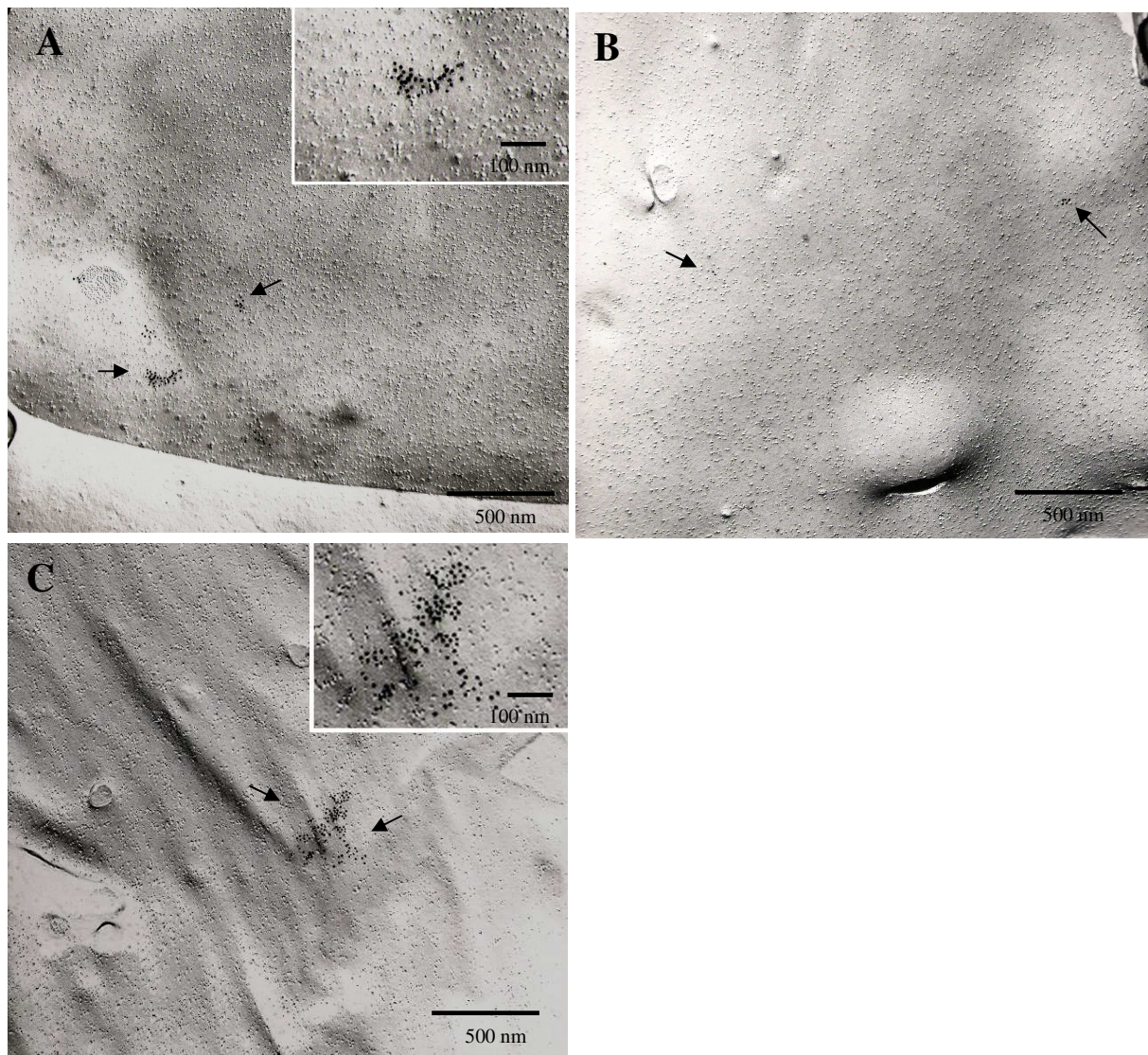


Abb. 21 : Repräsentative elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Aufnahmen von transfizierten Immuno-gold-markierten EGFP-Konstrukten des Wildtyps, EGFP-Kontrolle und CAAX-Mutante. Die protoplasmatische Bruchseite ist mit Anti-EGFP-Antikörpern markiert. **A** zeigt den Wildtyp, **B** die EGFP-Kontrolle und **C** die CAAX-Mutante. Die Pfeile deuten auf typische Bindungssignale. Die Kästchen am rechten Bildausschnitt in A und C zeigen eine vergrößerte Darstellung der Bindungssignale; Balken: 500 nm

Auf Grund der unterschiedlichen Quantität der Expression der PI-3-K  $\gamma$ , der CAAX-Mutante sowie der einzelnen Domänen bei nicht stabiler Transfektion der Konstrukte wurde eine halbquantitative Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen durchgeführt. Dabei wurde die Goldpartikelzahl in je 4 Aufnahmen auf einer Fläche von  $4 \mu\text{m}^2$  ausgezählt (Schlörmann et al. 2007). Daraus geht hervor, dass die CAAX-Mutante stärker an die Plasmamembran als der Wildtyp bindet, dieser jedoch stärker als die EGFP-Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 festgehalten.

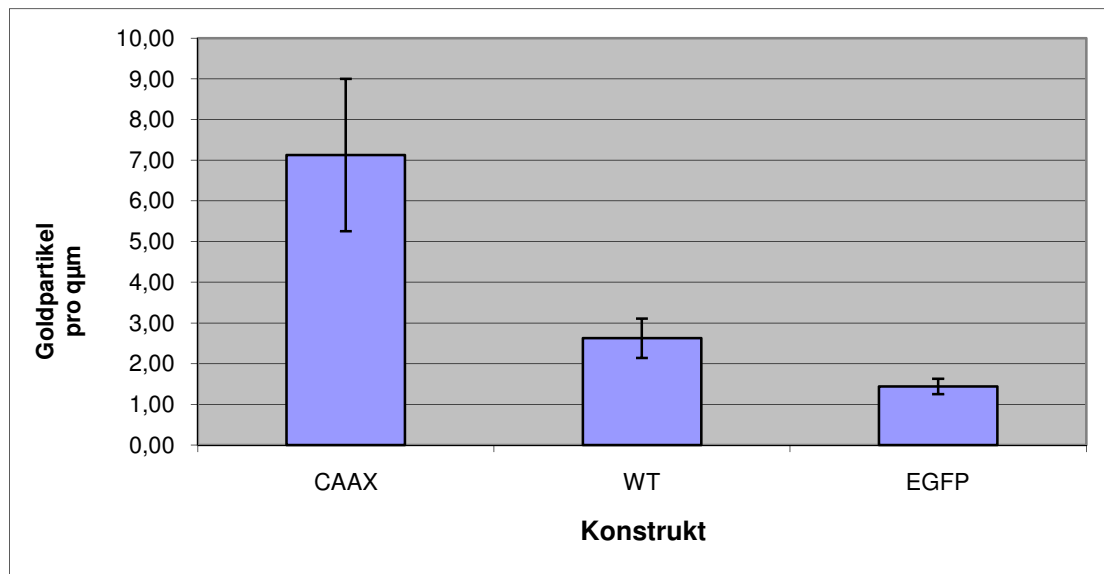


Abb. 22: Plasmamembranbindung von CAAX-Mutante, Wildtyp und EGFP

Halbquantitative Auswertung der Plasmamembranbindung des p110  $\gamma$ -Wildtyps, CAAX-Mutante und EGFP. Auszählung der Goldpartikel auf einer Fläche von  $4 \mu\text{m}^2$  in jeweils 4 Aufnahmen. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Goldpartikel pro  $\mu\text{m}^2$ .

Nachdem die Plasmamembranbindung des Wildtyps elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob dies auch für Domänen der PI-3-K  $\gamma$  zutrifft.

Die Kinase-Domäne läßt sich in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Form von kleinen Signal-Gruppen oder einzelnen Signal-Spots an der Plasmamembran nachweisen. Neben dieser Bindungsform lassen sich jedoch auch Membran-gebundene Protein-Aggregate finden, die eine sehr dichte, wolkenartige Struktur zeigen. Die helikale Domäne zeigt gleichfalls eine deutliche Plasmamembranbindung, die entweder im Zusammenhang mit Protein-Aggregaten oder in Form von solitären oder gruppierten Signal-Spots auftritt. Allerdings muss man feststellen, dass die helikale Domäne nach transienter Transfektion in HEK 293-Zellen nur schwach exprimiert wird und so eine vergleichende Aussage mit anderen Domänen erschwert ist. Der N-Terminus bietet in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine relativ starke Bindung an die Plasmamembran in Form einzelner Bindungssignale. Der Ras-Bindungs-Domäne zeigt einzelne oder gruppierte Signale an der Plasmamembran. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

In Zellen, die die C2-Domäne exprimierten, ließ sich keine oder nur eine marginale Plasmamembranbindung beobachten (in Abbildung nicht gezeigt).



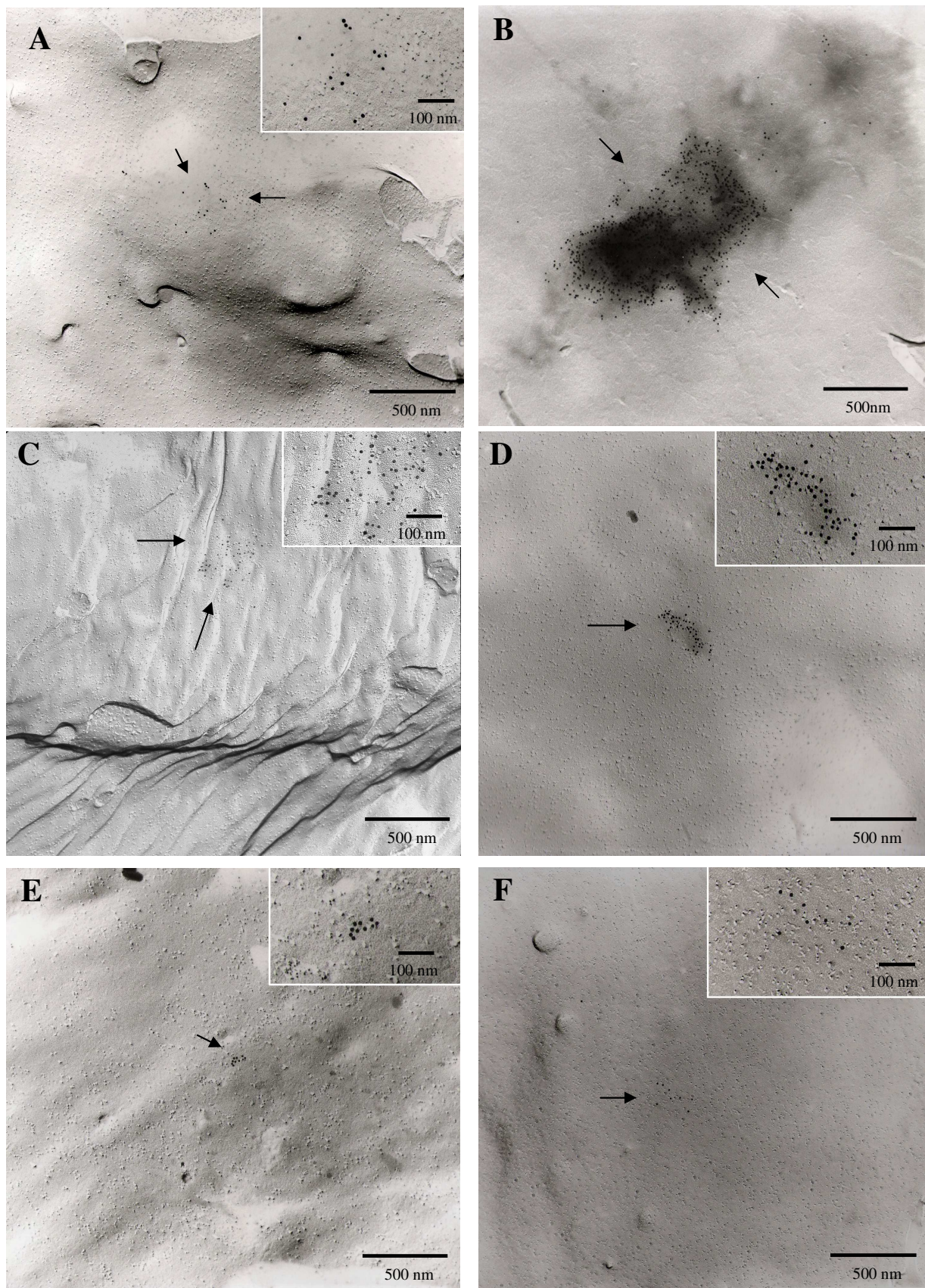


Abb. 23: Repräsentative elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Aufnahmen der Plasmamembran von Zellen mit transfizierten und Immunogold-markiertem EGFP-Konstrukten

Legende zu Abb 27 (Forts.): Die protoplasmatische Bruchseite ist mit Anti-EGFP-Antikörpern markiert. Die Pfeile deuten auf typische Bindungssignale der Kinase-Domäne (A-B), der helikalen Domäne (C-D), der Ras-Bindungs-Domäne (E) und des N-Terminus von PI-3-Kinase  $\gamma$  (F). Das Kästchen am rechten Bildausschnitt in A, C, D und F zeigt jeweils eine vergrößerte Darstellung der Bindungssignale; Balken: 500 nm

Die quantitative Auswertung der Plasmamembranbindung der einzelnen Domänen erfolgte analog dem Vorgehen zur Auwertung des Wildtyp und der CAAX-Mutante. Das Ergebnis ist in Abb. 24 gezeigt.

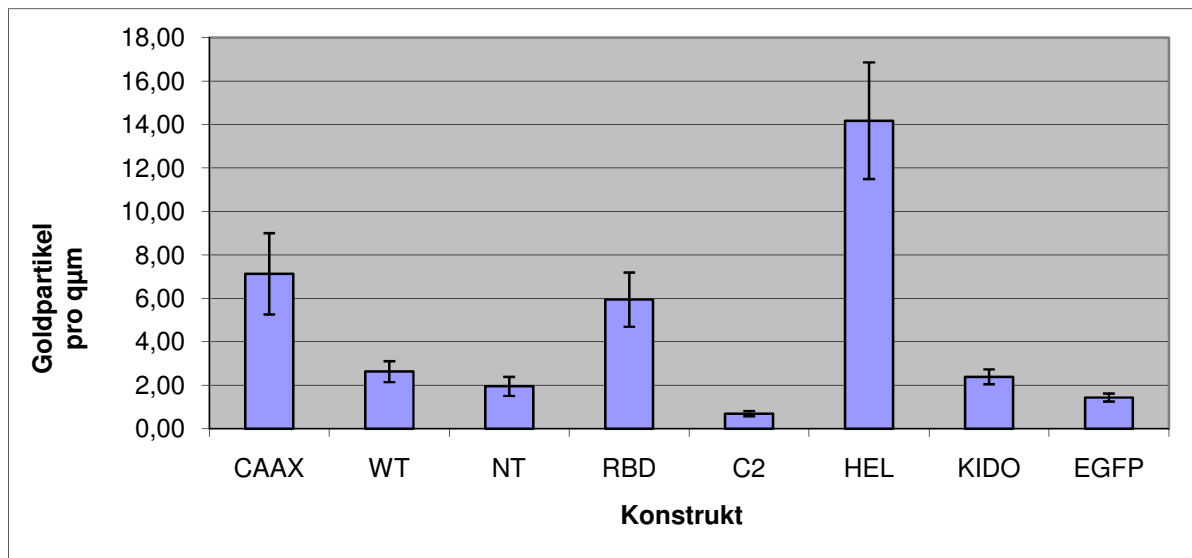


Abb. 24: Plasmamembranbindung der PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen sowie der Negativ- (EGFP) und Positivkontrolle (CAAX).

Halbquantitative Auswertung der Plasmamembranbindung der Domänen der PI-3-K  $\gamma$ . Auszählung der Goldpartikel auf einer Fläche von  $4 \mu\text{m}^2$  in jeweils 4 Aufnahmen. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Anzahl der Goldpartikel pro  $\mu\text{m}^2$ . Der Wildtyp, die CAAX-Mutante und die EGFP-Kontrolle sind zum Vergleich mit aufgetragen.

### 4.3 Untersuchung der zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase $\gamma$ und ihrer Domänen in HEK 293-Zellen mittels Zellfraktionierung

Nach den fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen sollte diese nun in Zellfraktionierungs-experimenten weiter charakterisiert werden. Dazu wurden die EGFP-gekoppelten Konstrukte des Wildtyp-Enzyms und der Domänen in HEK 293-Zellen bzw. HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen transient transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in hypotonem Lysepuffer mittels Ultraschall lysiert. Durch Zentrifugation wurden Kern-, Membran- und Cytosolfraktion gewonnen. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinverteilung durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese und anschließenden Western-Blott (genaue Beschreibung unter Material und Methoden). Gemäß den einzelnen

Zentrifugationsschritten läßt sich zunächst die Kernfraktion isolieren. Diese beinhaltet die Zellkerne, aber auch größere Zellreste, die während der hypotonen Lyse und folgendem Ultraschall nicht zerstört wurden. In der anschließenden Ultrazentrifugation werden Cytosol und die sogenannte Membranfraktion voneinander getrennt. Die Membranfraktion beinhaltet dabei nicht nur die Plasmamembran, sondern auch intrazelluläre, membranhaltige Kompartimente wie z.B. Mitochondrien, Endo- und Lysosomen oder Endoplasmatisches Retikulum. Andere Autoren bezeichnen diese Fraktion auch als Partikelfraktion (Stephens et al. 1994). So muß die Membranfraktion als Grobfraktion aller membranhaltigen, intrazellulären Kompartimente betrachtet werden.

#### **4.3.1 Reinheit der Fraktionen**

Um zu überprüfen, ob eine ausreichende Reinheit der gewonnenen Fraktionen (Kern, Membran, Cytosol) erreicht wurde, wurden zunächst ein LDH-Test (Laktat-Dehydrogenase-Test) und ein PI-4-Kinase-Test durchgeführt. Da die Laktat-Dehydrogenase ein ausschließlich cytosolisch lokalisiertes Enzym und die PI-4-Kinase ein membrangebundenes Enzym ist, kann durch Messung der Aktivität dieser Enzyme in den erhaltenen Fraktionen deren Reinheit beurteilt werden. Dazu wurden Aliquots der drei Fraktionen aus drei unabhängigen Versuchen einem LDH- bzw. PI-4-Kinase-Test unterzogen (nähere Angaben in Material und Methoden) und die gewonnenen Mittelwerte in Abbildung 25 graphisch dargestellt.

Beide Tests zeigen die Hauptaktivität der Marker-Enzyme in den betreffenden Fraktionen. So kann eine ausreichende Trennung der gewünschten Fraktionen durch Zentrifugation festgestellt werden.

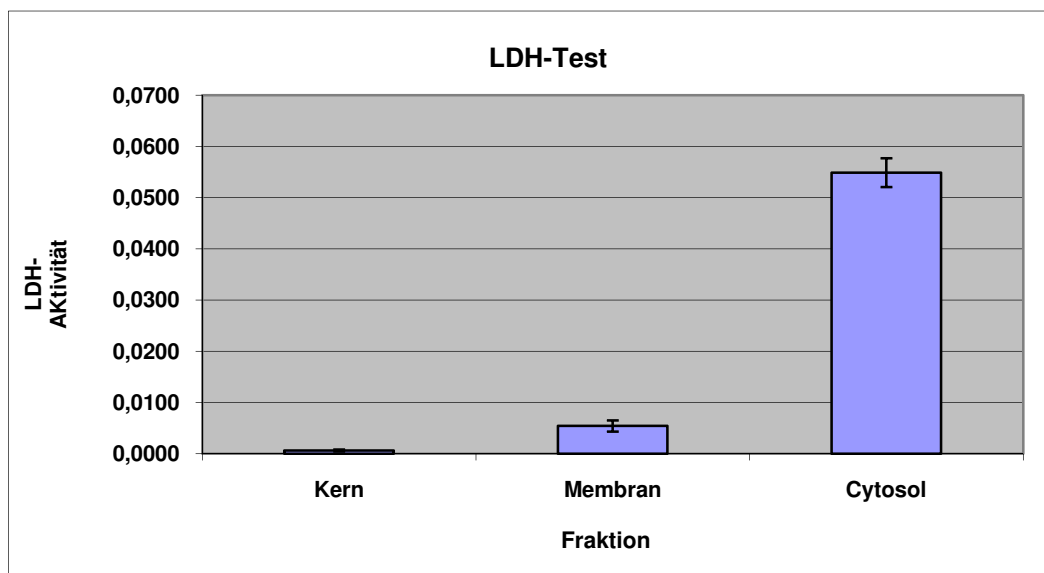
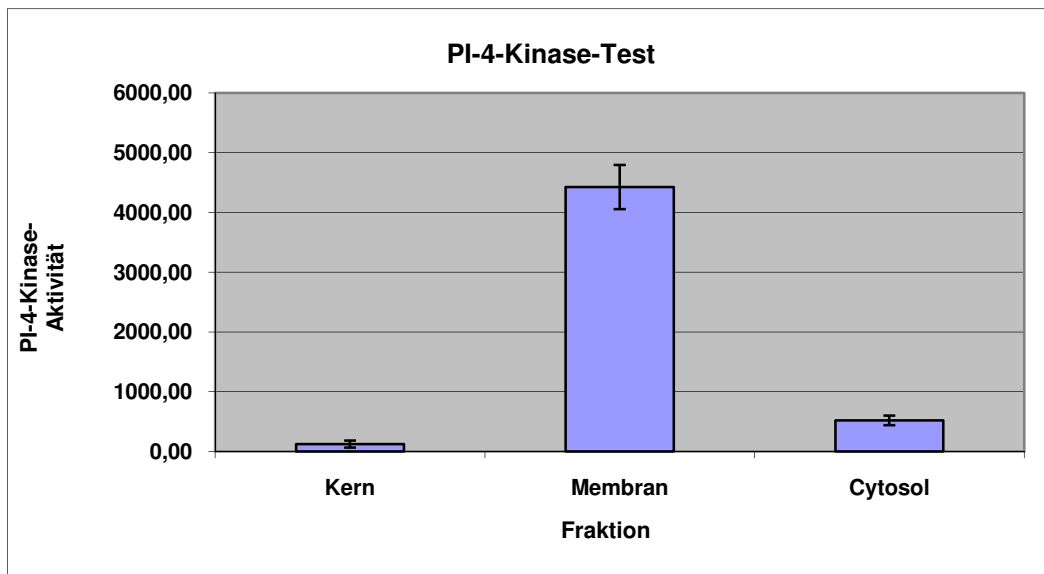


Abb. 25: Aktivität der Laktat-Dehydrogenase und PI-4-Kinase in der Kern-, Membran- und Cytosolfractionen  
 Proben der drei gewonnen Fraktionen wurden auf ihre Laktat-Dehydrogenase-Aktivität und PI-4-Kinase-Aktivität getestet. Die Aktivitätstests erfolgten entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden. In den Aktivitätstests sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) aus 3 unabhängigen Versuchen gezeigt.



#### 4.3.2 Subzelluläre Verteilung der EGFP-Kontrolle

Nach Expression und Fraktionierung der EGFP-Kontrolle in HEK 293-Zellen zeigte sich der weitaus größte Anteil des EGFP im Cytosol. Membran- und Kernfraktion erscheinen gleichverteilt zu sein, wie in Abbildung 26 dargestellt.

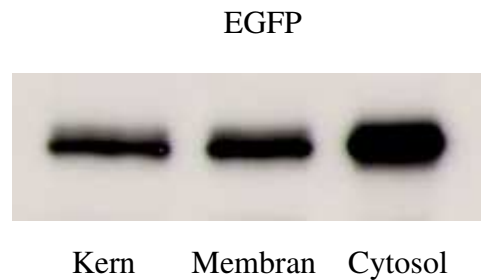


Abb. 26: Verteilung von EGFP zwischen Kern-, Membran- und Cytosolfractionen

Nach Gewinnung der Kern-, Membran- und Cytosolfraction gemäß den Angaben in Material und Methoden folgte die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE. Nach anschließendem Westernblot erfolgte der immunologische Nachweis mit einem monoklonalen Anti-EGFP-Antikörper zur Darstellung der Kern-, Membran- und Cytosolfractionen. Gezeigt ist ein von zwei unabhängigen Versuchen.

#### 4.3.3 Subzelluläre Verteilung des PI-3-K $\gamma$ -Wildtyps

Nach Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyp und anschließender Zellfraktionierung zeigt sich in Abwesenheit von p101 eine etwa gleich starke Verteilung des Proteins zwischen Kern, Membran und Cytosol. Nach Expression in Zellen bei Anwesenheit von p101 zeigt sich ein etwas größerer Anteil in der Membranfraktion bei etwa Gleichverteilung zwischen Kern und Cytosol. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 wiedergegeben.

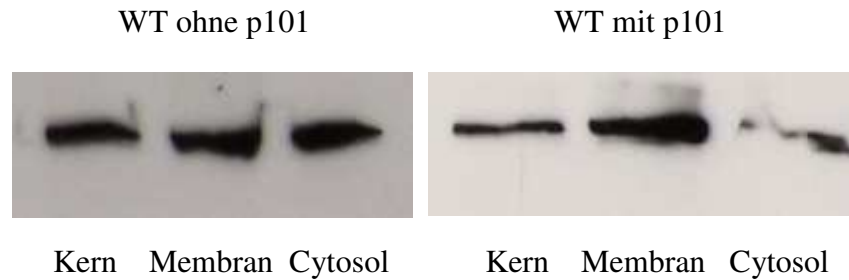


Abb. 27: Verteilung des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps mit und ohne p101 zwischen Kern-, Membran- und Cytosolfraktion. Nach Gewinnung der Kern-, Membran- und Cytosolfraktion gemäß den Angaben in Material und Methoden, folgte die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE. Nach anschließendem Westernblott erfolgte der immunologische Nachweis mit einem monoklonalem Anti-EGFP-Antikörper und Darstellung der Wildtypverteilung zwischen Kern-, Membran- und Cytosolfraktion. Gezeigt ist ein von zwei unabhängigen Versuchen.

#### 4.3.4 Subzelluläre Verteilung des N-Terminus der PI-3-K $\gamma$ und der Domänen in HEK 293-Zellen

Zunächst wurde die subzelluläre Verteilung der PI-3-K  $\gamma$ -Domänen in HEK 293-Zellen ohne p101 untersucht. Der N-Terminus findet sich zum größten Teil in der Membranfraktion. Ein geringerer Anteil ist in der Kernfraktion lokalisiert und nur ein kleiner Teil kann im Cytosol gefunden werden. Nach Expression der Ras-Bindungs-Domäne findet sich der größte Anteil in der Membranfraktion. Kernfraktion und Cytosol zeigen eine etwa gleich starke Verteilung, wobei der etwas größere Anteil im Kern zu finden ist. Der größte Anteil der C2-Domäne findet sich ebenfalls in der Membranfraktion. Die Kernfraktion zeigt einen geringeren Anteil, wohingegen im Cytosol fast nichts zu finden ist. Die helikale Domäne findet sich nach Fraktionierung in HEK 293-Zellen vornehmlich in der Membranfraktion. Ein etwas geringerer Anteil ist in der Kernfraktion lokalisiert. Im Cytosol sind nur Spuren zu finden. Die Kinase-Domäne zeigt in der Fraktionierung ebenfalls eine vorwiegende Bindung an Membranen, sowie eine weitaus schwächere Lokalisation im Kern. Im Cytosol ist kein Signal zu finden.

Nach Fraktionierung von HEK 293-Zellen in Anwesenheit von p101 ist für den N-Terminus der PI-3-K  $\gamma$ , die Ras-Bindungs-Domäne, die C2-Domäne und die Kinase-Domäne keine Änderung des subzellulären Verteilungsbildes festzustellen. Nach Expression der helikalen-Domäne mit p101 läßt sich eine Umverteilung zwischen Kernfraktion und Cytosol feststellen. So findet sich nun ein großer Anteil der Helikalen Domäne im Cytosol, wohingegen in der Kernfraktion kaum ein Signal nachweisbar ist. Der größte Anteil ist weiterhin in der Membranfraktion nachweisbar. In Abb. 28 sind die Ergebnisse wiedergegeben.



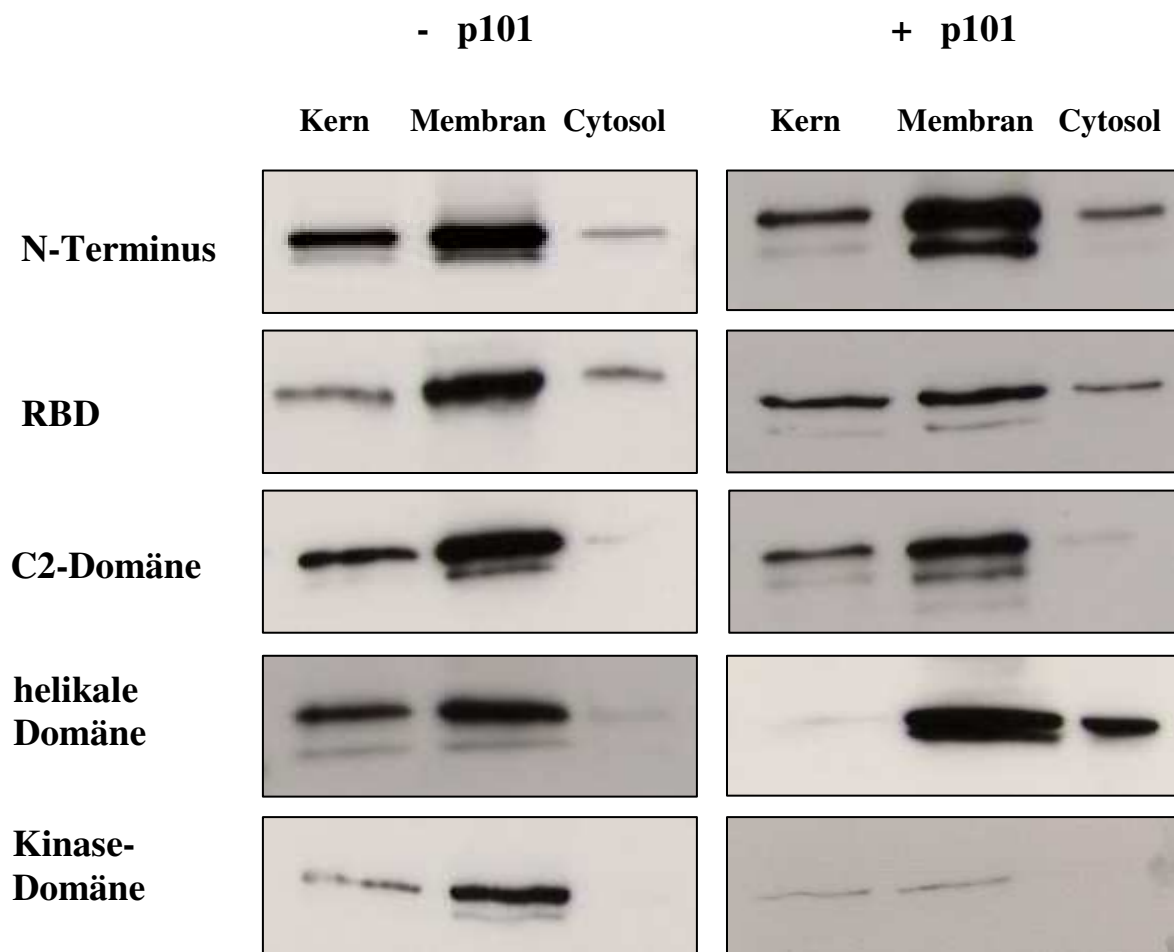


Abb. 28: Verteilung des N-Terminus und der Domänen der PI-3-K  $\gamma$  in An- und Abwesenheit von p101 zwischen Kern-, Membran- und Cytosolfraction

Nach der Zellfraktionierung gemäß den Angaben in Material und Methoden, folgte die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-PAGE. Nach anschließendem Westernblott erfolgte der immunologische Nachweis mit einem monoklonalem Anti-EGFP-Antikörper zur Darstellung der Verteilung der EGFP-Fusionsproteine zwischen den Kern-, Membran- und Cytosolfractionen. Gezeigt ist ein von zwei unabhängigen Versuchen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der PI-3-K $\gamma$ in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit p101

#### 5.1.1 Cytosol- und Membranlokalisation des p110 $\gamma$ –Wildtyp

In der vorliegenden Arbeit wurde EGFP C-terminal an den Wildtyp der p110  $\gamma$  gekoppelt, um die subzelluläre Lokalisation nach transienter Transfektion in FKS-stimulierten HEK 293-, COS 7- und NIH 3T3-Zellen direkt fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. Dabei fand sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine vorrangige cytosolische Lokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps, sowie eine schwache Fluoreszenz im Zellkern, wobei die Nukleoli ausgespart wurden. Eine Anreicherung an der Plasmamembran oder anderen intrazellulären Membranstrukturen wie dem endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat, Endosomen oder Lysosomen war nicht festzustellen. Allein eine myristoylierte PI-3-K  $\gamma$ -CAAX-Mutante zeigte eine exklusive Bindung an die Plasmamembran. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls den p110  $\gamma$  -Wildtyp in HEK 293- bzw. COS 7-Zellen überexprimiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht haben (Krugmann et al. 2002, Brock et al. 2003). Auch hier findet sich ein cytoplasmatisches Verteilungsmuster des Enzyms, mit schwacher nukleärer Lokalisation, jedoch ohne eindeutige Bindung an Membranstrukturen.

In Zellfraktionierungsexperimenten transient EGFP-p110  $\gamma$  überexprimierender HEK 293-Zellen konnten wir das Enzym in allen drei Zellfraktionen (Kern, Membran, Cytosol) nachweisen. Dieses Verteilungsmuster stimmt mit Fraktionierungsexperimenten endogener PI-3-K  $\gamma$  in FKS-stimulierten U937-Zellen sowie überexprimierter PI-3-K  $\gamma$  in FKS-stimulierten HEK 293-Zellen überein (Cornelia Kirsch, 2005). Dies zeigt, dass EGFP-gekoppelte PI-3-K  $\gamma$  ein vergleichbares subzelluläres Verteilungsmuster wie endogene bzw. überexprimierte PI-3-K  $\gamma$  bietet und in der Lage ist, an Membranen zu binden.

Die Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten. Wenn in den fluoreszenzmikroskopischen Bildern keine Membranbindung festzustellen ist, in den Fraktionierungsexperimenten jedoch ein großer Anteil in der Membranfraktion nachgewiesen wird, stellt sich die Frage, an welche Membranstrukturen die Bindung erfolgt. *In vivo* stellt PI-4,5-P<sub>2</sub> das Hauptsubstrat der PI-3-K  $\gamma$  dar, und so ist dessen subzelluläre Verteilung ein wichtiger Hinweis für eine mögliche Bindung des Enzyms an zelluläre Membranstrukturen. So zeigen Watt und Mitarbeiter (2002), dass PI-4,5-P<sub>2</sub> hauptsächlich an der Innenseite der Plasmamembran zu finden ist, aber auch an intrazellulären Membranstrukturen wie endoplasmatischem Retikulum, Endosomen, Golgi-Apparat sowie im Inneren des Zellkerns nachgewiesen werden kann (Watt et al. 2002). Um

einen direkten mikroskopischen Nachweis der Plasmamembranbindung der p110  $\gamma$  zu führen, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, in denen mittels Gefrierbruch nur die Plasmamembran dargestellt werden konnte. Dabei zeigt sich, dass EGFP-gekoppelte p110  $\gamma$  an der Plasmamembran gebunden vorliegt und so direkt mikroskopisch an der Plasmamembran nachgewiesen werden kann. In diesen Versuchen konnte erstmals eine von Signaltransduktionsprozessen unabhängige Bindung des Enzyms an die Plasmamembran *in vivo* nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt ein bestimmter Pool des Enzyms dauerhaft an der Plasmamembran gebunden vor, welcher sich nach Rezeptorstimulation weiter erhöhen kann. Zur Frage, ob es sich dabei um eine Bindung an PI-4,5-P<sub>2</sub> oder andere Lipide oder aber um eine Bindung an Proteine handelt, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage getroffen werden. Ausgehend von der Plasmamembranbindung des Enzyms in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, ist anzunehmen, dass neben der Plasmamembran auch intrazelluläre Membranstrukturen als Bindungspartner für p110  $\gamma$  dienen können. So konnte für die Klasse I PI-3-Kinase-Isoform p110 $\beta$  gezeigt werden, dass diese in U937-Zellen in starkem Maße an intrazelluläre Fettkörper gebunden vorliegt (Yu et al., 2000).

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen kann eine Membranbindung von Proteinen nur dann festgestellt werden, wenn ein signifikanter Unterschied in der emittierten Fluoreszenz von zwei optisch zu differenzierenden Kompartimenten besteht. So ist eine vielfach größere Signaldichte an der 2-dimensionalen Plasmamembran im Vergleich zum 3-dimensionalen Cytosol nötig, um einen sichtbaren Unterschied zu erzeugen. Da die PI-3-Kinase  $\gamma$  im Cytosol sowie an der Plasmamembran gebunden vorliegt, ergeben sich keine signifikanten und differenzierbaren Unterschiede zwischen den Fluoreszenzsignalen in den beiden Kompartimenten und der Nachweis einer Plasmamembranbindung bei Gleichverteilung ist mit dieser Methode nicht zu führen. Robinson und Dixon (2005) fanden bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Myotubularin-Proteine MTMR2 und MTMR13 im fluoreszenzmikroskopischen Bild ebenfalls eine vorwiegende cytosolische Lokalisation, wohingegen in Zellfraktionierungsexperimenten eine Assoziation an intrazelluläre Membranstrukturen festgestellt wurde (Robinson und Dixon 2005). Eine Differenzierung zwischen cytosolischer und Plasmamembran bzw. intrazellulär-membranöser Lokalisation mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erscheint möglich, wenn signifikante quantitative Unterschiede an exprimierten Proteinen und damit an Signalen vorhanden sind.

### **5.1.2 Cytosol- und Membranlokalisation der p110 $\gamma$ -Domänen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EGFP-gekoppelte p110  $\gamma$  sowohl im Cytosol, im Zellkern als auch an Membranen gebunden nachgewiesen werden kann, sollten die einzelnen Domänen des Enzyms bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation untersucht werden. Hierzu wurden auch diese C-terminal mit EGFP markiert und mittels konfokaler

Fluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie und Zellfraktionierung untersucht. Ziel war hierbei, jene Domänen des Enzyms zu identifizieren und zu charakterisieren, welche eine Membranlokalisation des Wildtyp-Enzyms determinieren.

In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des N-Terminus ist der Hauptteil im Zellkern lokalisiert, mit schwacher cytoplasmatischer Lokalisation. In Übereinstimmung damit findet man nach Zellfraktionierung eine starke Anreicherung in der Kernfraktion und nur eine schwache in der Cytosolfraktion. Allerdings lässt sich der größte Anteil des Proteins in der Membranfraktion nachweisen. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand sich für den N-Terminus eine dem Wildtyp vergleichbare Bindung an die Plasmamembran. Doch wie wird die starke Membranbindung des N-Terminus vermittelt? Schon länger ist bekannt, dass Aminosäuresequenzen mit gehäuft basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin Phosphoinositide binden können. So beschreiben Janmey und Mitarbeiter, dass Peptidsequenzen, die mit einer Reihe von basischen Aminosäuren angereichert sind, Polyphosphoinositide wie PI-4-P und PI-4,5-P<sub>2</sub> binden können (Janmey et al 1992). Auch die Phosphatase PTEN benötigt für ihre Bindung an Phosphoinositide wie für ihre volle Aktivität eine Sequenz aus basischen Aminosäuren (K<sup>263</sup>MLKKDK<sup>269</sup>) (Downes et al. 2004). McLaughlin und Murray konnten für MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) zeigen, dass für dessen Membraninteraktion basische hydrophobe Regionen im Protein nötig sind (McLaughlin und Murray 2005). Heo und Mitarbeiter untersuchten die Plasmamembranlokalisation von mehr als 100 fluoreszenzmarkierten Proteinen und wiesen nach, dass die meisten dieser Proteine Regionen mit polybasischen und hydrophoben Aminosäuren enthielten und diese wichtig für die Plasmamembranbindung waren (Heo et al. 2006). Der N-Terminus weist die hochbasische Aminosäuresequenz R<sup>17</sup>RRRR in seinem N-terminalen Anteil auf. Diese könnte die starke Membranbindung des N-Terminus vermitteln.

Auch die Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  zeigt im fluoreszenzmikroskopischen Bild eine cytoplasmatische Verteilung mit schwacher Anreicherung im Zellkern. In den Zellfraktionierungsexperimenten findet sich der größte Anteil in der Membranfraktion. Eine etwa gleich starke Verteilung findet sich zwischen Cytosol und Kern. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten wir für die RBD eine, im Vergleich zum Wildtyp etwas verstärkte Plasmamembranlokalisation zeigen, wodurch der hohe Anteil in der Membranfraktion erklärt werden kann. Die Ras-Bindungs-Domäne von c-Raf ist nach transienter Überexpression in COS 7-Zellen ebenfalls cytoplasmatisch und im Zellkern lokalisiert (Augsten et al. 2006). Schon lange ist bekannt, dass die PI-3-K  $\gamma$  ein Effektor der kleinen GTPase Ras ist (Rubio et al. 1997, Pacold et al. 2000). Die Superfamilie der Ras-Proteine (H-, N-, K-Ras), stellen molekulare Schalter dar, die im Wechsel zwischen dem inaktiven GDP-gebundenen und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand in verschiedene Signaltransduktionskaskaden eingreifen können. Der Wechsel vom GDP-gebundenen in den GTP-gebundenen Zustand geht mit einer Konformationsänderung in den sogenannten switch

I- und switch II-Regionen von Ras einher, was dem Protein ermöglicht, an verschiedene Effektoren wie z.B. Raf, RalGDS oder PI-3-Kinasen zu binden und Signale weiterzuleiten (Suire et al. 2002). Die Bindung an Ras erfolgt über Ras-Bindungs-Domänen der jeweiligen Effektoren. Pacold und Mitarbeiter konnten den genauen Bindungsmechanismus von H-Ras an p110  $\gamma$  anhand der Kristallstruktur eines p110  $\gamma$ /Ras-GMPPNP-Komplexes aufklären (Pacold et al. 2000). So vermitteln die Aminosäurereste 255-267 der RBD eine Reorientierung von Ras, wodurch neben der switch I-Region auch die switch II-Region von Ras an der Bindung beteiligt ist und neben der RBD auch der C-terminale Teil der Kinase-Domäne gebunden wird (Pacold et al. 2000). Schließlich kommt es zu einer Konformationsänderung von p110  $\gamma$  durch die Bindung von Ras, wodurch die Bindungsseite für Phosphoinositid-Kopfgruppen in der Kinase-Domäne seine Ausrichtung ändert und so den allosterischen Effekt auf die Enzym-Aktivität erklärt (Pacold et al. 2000). Daneben wurde von einigen Autoren vermutet, dass Ras als membrangebundenes Protein auch eine Translokation der PI-3-K  $\gamma$  an die Plasmamembran vermitteln könne, wie es für die PLC $\epsilon$  und die Raf-Kinase gezeigt wurde (Walker et al. 1999, Pacold et al. 2000, Song et al. 2001, Stokoe et al. 1994). Suire und Mitarbeiter konnten jedoch keine Translokation von p110  $\gamma$  durch Ras nachweisen (Suire et al. 2002). Neuere Studien konnten aber eine Ras vermittelte Translokation von p110  $\gamma$  an die Plasmamembran zeigen (Kurig et al. 2009). Da p110  $\gamma$  und Ras über die Ras-Bindungs-Domäne miteinander interagieren, haben wir untersucht, ob die konstitutiv aktive und Membran-gebundene H-Ras-Mutante H-RasG12V in der Lage ist, die Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  zu binden und diese an die Plasmamembran zu translozieren. Dazu wurde in HEK 293-Zellen EGFP-WT und EGFP-RBD mit DsRed-H-RasG12V co-exprimiert und die subzelluläre Verteilung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es findet sich nach Co-Expression von p110  $\gamma$ -Wildtyp und H-RasG12V keine Co-Lokalisation der beiden Proteine. Der p110  $\gamma$ -Wildtyp zeigte das schon bekannte cytoplasmatische Verteilungsmuster. H-RasG12V ließ sich hauptsächlich in der Plasmamembran und als intrazelluläre Aggregate nachweisen.

Im Gegensatz dazu konnte nach Co-Expression von RBD und H-RasG12V erstmals eine Translokation der Ras-Bindungs-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  an die Plasmamembran mikroskopisch gezeigt werden. Hierdurch wird bestätigt, dass EGFP-gekoppelte RBD in der Lage ist, aktives H-Ras zu binden, und dass die Kopplung an EGFP keine Konformationsänderung im exprimierten Protein verursacht.

Augsten et al. konnten zeigen, dass die RBD von c-Raf nach Co-Expression mit H-RasG12V an die Plasmamembran von COS 7-Zellen dirigiert wird und daß die Plasmamembran das vorrangige zelluläre Kompartiment der Ras-Aktivierung darstellt (Augsten et al. 2006). Prior und Mitarbeiter gelang es, in elektronenmikroskopischen Untersuchungen Mikrodomänen von aktivem Ras direkt in der Plasmamembran nachzuweisen (Prior et al. 2003a,b). Andere Autoren wiesen darauf hin, dass aktives Ras auch

am Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum zu finden ist (Chiu et al. 2002). So ist die Lokalisation von aktivem Ras ein Hinweis auf die Lokalisation der RBD. Hierdurch könnte in den stimulierten HEK 293-Zellen der hohe Anteil in der Membranfraktion sowie die Translokation an die Plasmamembran durch Bindung der RBD an aktives Ras erklärt werden. In *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten für die Ras-Bindungs-Domäne, ähnlich der C2-Domäne, nur eine schwache Bindung an Phospholipide nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2010). Somit ist eine Protein-Protein-Interaktion als vorangiger Bindungsmechanismus wahrscheinlich. Es ist denkbar, dass ein gewisser Pool an RBD frei cytosolisch lokalisiert ist, während ein anderer Teil in stimulierten Zellen an aktives Ras und somit an Membranen bindet.

Für die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  findet sich in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen neben einer cytoplasmatischen Verteilung auch eine etwa gleich starke Anreicherung im Zellkern. Anreicherungen an Membranstrukturen lassen sich nicht feststellen. Die C2-Domäne weist in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen unter den Domänen die geringste Bindungsaffinität zur Plasmamembran auf und lässt sich nur vereinzelt an die Plasmamembran gebunden nachweisen. In den Fraktionierungsexperimenten findet sich jedoch im Gegensatz dazu der größte Teil in der Membranfraktion, ein geringerer Anteil im Kern und nur sehr wenig im Cytosol. In-vitro Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die C2-Domäne nur eine geringe Bindung an PS-, PA-, PI-, PI-4P- und PI-4,5-P<sub>2</sub>-haltige Liposomen aufweist und dies die geringe Bindung an die Plasmamembran erklären kann (Schmidt et al. 2010). Die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  gilt als Ca<sup>2+</sup>-unabhängig (Walker et al. 1999). Damit übereinstimmend konnte in in-vitro Experimenten unserer Arbeitsgruppe keine stärkere Bindung an Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylinositol, Phosphatidyl-4-phosphat oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat für den PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyp noch für seine C2-Domäne unter dem Einfluss von Kalzium gemessen werden (persönliche Mitteilung C. Kirsch, C. Schmidt). Pepio und Mitarbeiter (1998) wiesen darauf hin, dass Ca<sup>2+</sup>-unabhängige C2-Domänen keine konstitutive Bindung an Lipide zeigen (Pepio et al. 1998). So ist für die C2-Domäne von p110  $\gamma$  ein ähnliches Membranbindungsverhalten wie bei Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen C2-Domänen denkbar und eine geringe konstitutive Bindung an die Plasmamembran nicht verwunderlich. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  über eine Lipid-Interaktion keine Membranbindung vermitteln kann. Möglicherweise spielen aber auch Autophosphorylierungsvorgänge bei der Vermittlung der Lipidbindung eine Rolle, da die PI-3-K  $\gamma$  ebenfalls zur Autophosphorylierung fähig ist. Pepio und Sossin konnten zeigen, dass durch Auto-Phosphorylierung der C2-Domäne von PKC  $\text{A}\alpha$  an Serin36 eine Konformationsänderung der Kalzium-Bindungs-Schleife 1 vermittelt wird, was ihre Ausrichtung gegenüber Lipiden ändert und eine Bindung an Phosphatidylserin ermöglicht (Pepio und Sossin 2001). Die PI-3-K  $\gamma$  wird an Serin 1101 im Bereich der Kinase-Domäne autophosphoryliert, und nicht im Bereich der C2-Domäne (Czupalla et al. 2003). Allerdings konnten Czupalla und Mitarbeiter nach Austausch des Serin 1101 gegen Alanin

weiterhin eine Phosphorylierung im Enzym nachweisen, was auf eine weitere Autophosphorylierungsstelle N-terminal hindeutet. Ob dabei die C2-Domäne involviert ist, ist derzeit nicht untersucht.

Neben Phospholipiden können aber auch Proteine als Interaktionspartner für C2-Domänen dienen. So zeigt die C2-Domäne von PKC $\delta$  keine Bindung an Phospholipide, bindet aber stattdessen an Actin und GAP-43 (Stahelin et al. 2004, Lopez-Lluch et al. 2001). Benes und Mitarbeiter konnten weiter zeigen, dass die C2-Domäne von PKC $\delta$  mit der Phosphotyrosinkinase Scr sequenzabhängig einen Multiproteinkomplex bildet und so, neben SH2- und PTB-Domänen, eine weitere Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne darstellt (Benes et al. 2005). So ist auch für die C2-Domäne der PI-3-K  $\gamma$  eine vorrangige Protein-Protein-Interaktion wahrscheinlich. Damit übereinstimmend findet sich der größte Anteil der C2-Domäne nach Fraktionierung in der Membranfraktion wieder. Dieser Anteil könnte durch Interaktionen mit z.B. Zytoskelettproteinen erklärt werden. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Vermutung wurden jedoch nicht durchgeführt.

Nach transienter Expression und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der helikalen Domäne zeigte sich, in allen drei untersuchten Zelllinien vergleichbar, eine vorwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins mit schwachen cytoplasmatischen Signalen. Naga Prasad und Mitarbeiter fanden in ihren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach Expression der helikalen Domäne in HEK 293-Zellen, die sie als PIK-Domäne bezeichnen, eine cytosolische Lokalisation der Domäne ohne Signale im Zellkern oder an der Plasmamembran (Naga Prasad et al. 2001). Allerdings verwendeten sie dazu eine N-terminal Flag-markierte und etwas größere (aa535-732) helikale Domäne. Eine Erklärung für die Diskrepanz der verschiedenen Lokalisationsbefunde wäre, dass die von Naga Prasad und Mitarbeitern verwendete Domäne aufgrund der unterschiedlichen Markierung und Größe eine andere Faltung als die von uns verwendete Domäne aufweist und so eine andere Lokalisation nach Expression in HEK 293-Zellen zeigt. In unseren Zellfraktionierungsexperimenten fand sich ein Großteil des Proteins in der Kernfraktion, dagegen nur ein sehr schwaches Signal im Cytosol. Allerdings konnten wir auch hier den größten Teil der helikalen Domäne in der Membranfraktion nachweisen. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließ sich jedoch für die helikale Domäne eine gegenüber dem Wildtyp deutlich stärkere Plasmamembranbindung zeigen, was den relativ starken Anteil in der Membranfraktion erklären könnte. So konnte in *in-vitro*-Experimenten unserer Arbeitsgruppe für die helikale Domäne eine dem Wildtyp vergleichbare Bindung an Phospholipide gezeigt werden (Schmidt et al. 2010). Walker und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die helikale Domäne in ihrer Struktur große Ähnlichkeit zur regulatorischen Untereinheit PR65/A der Protein-Phosphatase 2A zeigt (Walker et al. 1999). PR65/A besitzt ein sogenanntes HEAT-Motiv, das Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Groves et al. 1999). In der helikalen Domäne von p110  $\gamma$  ist zwar kein HEAT-Motiv nachweisbar, jedoch vermuteten Walker und Mitarbeiter, dass die

helikale Domäne an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (Walker et al. 1999). Mit dieser Vermutung übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation von  $\beta_2$ -Rezeptoren die PI-3-K  $\gamma$  durch Interaktion der Helikalen Domäne mit der  $\beta$ ARK1 an die Plasmamembran von HEK 293-Zellen transloziert werden kann, und damit Anteil an der Sequestration und Endozytose von  $\beta_2$ -Rezeptoren nach anhaltender Stimulation hat (Naga Prasad et al. 2001, 2002). Die Überexpression der helikalen Domäne in HEK 293-Zellen unterbricht die PI-3-Kinase /  $\beta$ ARK1-Interaktion und inhibiert die nach Agonisten-Stimulation vermittelte Translokation des AP-2-Adaptor-Proteins an den  $\beta_2$ -Rezeptor und dessen Internalisierung und Endozytose (Naga Prasad et al. 2002). Weiterhin konnte in Kardiomyozyten nach Überexpression der helikalen Domäne eine Internalisierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren verhindert und die Stimulierbarkeit durch Agonisten erhalten werden (Perrino et al. 2005). Darüber hinaus konnte an Kardiomyozyten des Schweins mit induzierter Herzinsuffizienz gezeigt werden, dass nach adenoviralem Gentransfer der helikalen Domäne die durch Agonisten stimulierbare Kontraktilität der Herzmuskelzellen wieder hergestellt werden konnte (Perrino et al. 2005). Eine Interaktion der helikalen Domäne mit  $G_{\beta\gamma}$  konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Naga Prasad et al. 2002). Auch das FKBP12-Rapamycin-assoziiertes Protein FRAP, das menschliche Homolog von TOR der Hefezelle, besitzt im N-Terminus eine Reihe von Tandem-HEAT-Motiven, die Protein-Protein-Interaktionen mit CLIP-170, Gephyrin und Raptor vermitteln können (Choi et al. 2002, Hara et al. 2002, Kim et al. 2002, Sabatini et al. 1999). Drenan und Mitarbeiter (Drenan et al. 2004) konnten zeigen, dass FRAP über einen Teil der HEAT-Motive an der Außenseite des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates lokalisiert ist. Es konnten jedoch keine Aussagen zum Charakter dieser Bindung getroffen werden. Aus all dem kann geschlußfolgert werden, dass die helikale Domäne zum einen über Interaktion mit Phospholipiden oder möglicherweise auch über Interaktion mit Proteinen eine starke Membranbindung vermitteln kann.

Die Kinase-Domäne zeigt sich im fluoreszenzmikroskopischen Bild als vorwiegend cytosolisch lokalisiert mit sehr schwachem Kernsignal. Im Gegensatz dazu findet sich in der Zellfraktionierung der größte Anteil in der Membranfraktion und eine geringerer im Kern, aber kaum ein Signal im Cytosol. Übereinstimmend damit läßt sich in der elektronenmikroskopischen Untersuchung eine starke Bindung an die Plasmamembran nachweisen. Diese Befunde lassen insgesamt die Vermutung zu, dass die Kinase-Domäne weniger cytosolisch als vielmehr an Membranen gebunden vorliegt. Unterstützt wird diese Vermutung durch *in vitro* Experimente unserer Arbeitsgruppe, in denen eine dem Wildtyp vergleichbare Bindung an Phospholipide nachgewiesen werden konnte (Schmidt et al. 2010). Die starke Membranbindung *in vivo* und *in vitro* ist nicht verwunderlich, da die Kinase-Domäne den Ort der Substratbindung als auch der Katalyse darstellt. So wiesen Walker und Mitarbeiter auf einen möglichen Bindungsmechanismus der Phosphatgruppen des Hauptsubstrats PI-4,5-P<sub>2</sub> an die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin im Bereich der Kinase-Domäne der PI-3-K  $\gamma$



hin. Dabei interagiert das 1-Phosphat mit Lysin 807/808, das 5-Phosphat mit Lysin 973 und das 4-Phosphat mit Arginin 947 und Lysin 973 (Walker et al. 1999). So wäre denkbar, dass die Substratbindung auch für die Membranbindung des Kinase-Domäne verantwortlich ist, und so möglicherweise eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Membranbindung des Wildtyp-Enzyms spielt.

Insgesamt muss man feststellen, dass der N-Terminus, die Ras-Bindungs-Domäne, die helikale Domäne sowie die Kinase-Domäne eine Rolle bei der Membranbindung des Enzyms spielen. Die C2-Domäne erscheint für die Bindung des Enzyms an die Plasmamembran nicht notwendig zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil der PI-3-K  $\gamma$  (aa 4-740) bestehend aus dem N-Terminus, der Ras-Bindungs-Domäne, der C2-Domäne und der helikalen Domäne in gleichem Maße anionische Phospholipid-Vesikel wie der Wildtyp binden kann, wohingegen der C-terminale Peptidsequenz (aa 740-1068), die die verkürzte Kinase-Domäne enthält, eine schwächere Bindung zeigt (Kirsch et al. 2001).

Insgesamt wäre denkbar, dass die Membranbindung des Wildtyp-Enzyms nicht allein auf die Membranbindungseigenschaften der einzelnen Domänen zurückzuführen ist, sondern im Rahmen der Anordnung dieser zueinander. So ist vorstellbar, dass, bedingt durch die Tertiärstruktur, die Lipid- oder Proteinbindungsseiten der Domänen in ihrer Ausrichtung zur Enzymoberfläche die Bindungseigenschaften des Enzyms beeinflussen. Darüber hinaus könnte auch die funktionell bedingte Konformationsänderung des Enzyms zu veränderten Bindungseigenschaften führen. Dies würde zur Erklärung der differentiellen Funktion in Cytosol und an Membranen beitragen.

### **5.1.3 Kernlokalisation des p110 $\gamma$ –Wildtyp und seiner Domänen**

Neben einer cytosolischen und Membran-gebundenen Lokalisation konnte der PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyp nach Expression in HEK 293-, COS 7- und NIH 3T3-Zellen auch im Zellkern nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich für den Wildtyp ein homogenes nukleäres Verteilungsmuster unter Aussparung der Nukleoli. Auch andere Autoren konnten eine nukleäre Teil-Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  und anderer am Phosphoinositidstoffwechsel beteiligter Proteine nachweisen. So kommt es in HepG2-Zellen nach Serumstimulation zur G $\beta$  $\gamma$ -vermittelten Translokation der PI-3-K  $\gamma$  in den Zellkern (Metjian et al. 1999). In vaskulären glatten Muskelzellen des Schweins konnte ein durch G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> reguliertes 117 kDa-Protein im Kern nachgewiesen werden, das Ähnlichkeit mit p110  $\gamma$  zeigt (Bacqueville et al. 2001). Daneben konnten Lu und Mitarbeiter zeigen, dass p85, die regulatorische Untereinheit der Klasse I<sub>A</sub> PI-3-Kinasen, in Zellkernen von Leberzellen der Ratte lokalisiert ist (Lu et al. 1998). Die Phosphatasen PTEN und SHIP-2 können ebenfalls in Zellkernen von VSMC-Zellen nachgewiesen werden, und haben dort Anteil an der Regulation von PI-3-Kinase-Signalwegen (Deleris et al. 2003). Insgesamt häufen sich die Hinweise, dass 3-OH-phosphorylierte Phosphoinositide im Zellkern Anteil an der Regulation von Proliferation und

Differenzierung eukaryoter Zellen haben, und so ist es nicht verwunderlich, dass die PI-3-K  $\gamma$  im Zellkern zu finden ist. Der Mechanismus und die Regulation der Kerntranslokation des Enzyms sind jedoch noch ungeklärt. Nach Expression der einzelnen Enzymdomänen in verschiedenen Zelllinien und deren fluoreszenzmikroskopischer Auswertung, sollte nun neben der cytosolischen und Membranlokalisation auch eine mögliche Kernlokalisation der einzelnen Domänen untersucht und deren Rolle in der Kernlokalisation des Wildtyps beschrieben werden. Dabei lässt sich feststellen, dass die Ras-Bindungs-Domäne eine dem Wildtyp vergleichbare nukleäre Verteilung zeigt, wohingegen die Kinase-Domäne kaum im Zellkern zu finden ist. Die C2-Domäne weist dagegen eine Gleichverteilung zwischen Cytosol und Kern auf. Allein der N-Terminus und die helikale-Domäne zeigen eine vornehmliche Lokalisation im Zellkern. So ist anzunehmen, dass die Kernlokalisation des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps durch den N-Terminus, die Ras-Bindungs-Domäne, die C2-Domäne und/oder die helikale Domäne gesteuert wird. Dagegen scheint die Kinase-Domäne keine Kernlokalisation zu bedingen.

Für den Kernimport der einzelnen EGFP-gekoppelten Konstrukte kommen Diffusion oder energieverbrauchende, an das Vorhandensein einer Kernlokalisationssequenz (NLS) gebundene Translokationsvorgänge in Betracht. So wäre für den Kernimport des Wildtyps mit einem Molekulargewicht von ca. 145 kDa in jedem Fall eine NLS im Protein nötig. Auch der N-Terminus ist mit ca. 60-65 kDa zu groß für einen diffusionsvermittelten Transport. Die Ras-Bindungs-, C2- und helikale Domäne haben mit jeweils ca. 50-55 kDa ein grenzwertiges Molekulargewicht. Metjian und Mitarbeiter (1999) beschrieben die Serum-stimulierbare Translokation der PI-3-K  $\gamma$  in den Kern von HepG2-Zellen und wiesen dabei auf zwei mögliche Arginin- (R) bzw. Lysin-reiche (K) Kernlokalisationssequenzen im Protein hin: R<sup>17</sup>RRRR und K<sup>806</sup>KKP. In der Aminosäuresequenz des Wildtypproteins finden sich mit R<sup>48</sup>KCKS, R<sup>358</sup>KER, und K<sup>250</sup>MAKKK drei weitere Lysin- bzw. Lysin- und Arginin-reiche Sequenzen, die als NLS in Frage kommen könnten. R<sup>17</sup>RRRR und R<sup>48</sup>KCKS finden sich dabei im N-Terminus und könnten so dessen vornehmliche Kernlokalisation erklären. Metjian und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, dass nach Deletion der ersten 34 Aminosäuren weiterhin ein Kernimport des Wildtyps möglich ist, und dass nach Deletion der ersten 82 Aminosäuren eine ausschließliche Lokalisation im Kern zu finden ist (Metjian et al. 1999). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass entweder R<sup>17</sup>RRRR und R<sup>48</sup>KCKS für eine Kernlokalisation des Wildtyps nicht essentiell sind, oder aber, dass ein Zusammenspiel von einer oder mehrerer weiterer NLS für einen Kerntransport nötig sind. Die schon bekannte Sequenz K<sup>806</sup>KKP liegt im Bereich der 75 kDa schweren Kinase-Domäne, welche jedoch nur eine marginale Kernlokalisation zeigt. Dies deutet darauf hin, dass diese Sequenz wahrscheinlich keine Rolle im aktiven Kernimport der Domäne wie auch des Wildtyps spielt. Im Bereich der Ras-Bindungs-Domäne liegt die Lysin-reiche Sequenz K<sup>250</sup>MAKKK, welche die anteilige nukleäre Lokalisation der Ras-Bindungs-Domäne erklären könnte. K<sup>250</sup>MAKKK scheint aber keine dominante Rolle in der Kernlokalisation des Wildtyps zu spielen, da die Ras-Bindungs-

Domäne selber nicht ausschließlich im Kern zu finden ist. Als weitere mögliche Kernimportsequenz findet sich R<sup>358</sup>KER am Anfang der C2-Domäne und könnte so deren Kernimport wie auch den des Wildtyps mitbedingen. In Übereinstimmung damit konnte in der C2-like-Domäne der PI-3-Kinase-C2 $\alpha$  die stark basische Aminosäuresequenz K<sup>1608</sup>RKTKISRKTR, die als NLS für den Kernimport der Kinase dient, nachgewiesen werden (Didischenko und Thelen 2001). Für die helikale Domäne läßt sich in der Aminosäuresequenz der PI-3-K  $\gamma$  bisher keine NLS finden. Die helikale-Domäne wäre mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa jedoch in der Lage, passiv in den Kern zu diffundieren. Insgesamt finden sich also neben der bekannten Sequenz R<sup>17</sup>RRRR mit R<sup>48</sup>KCKS, R<sup>358</sup>KER und K<sup>250</sup>MAKKK drei weitere potentielle Kernlokalisationssequenzen, die einen Kernimport des Wildtyps vermitteln könnten. Da keine der Sequenzen eine ausschließliche Kernlokalisierung der betreffenden Domänen bedingt oder aber nach deren Deletion weiterhin ein Kernimport des Wildtyps möglich ist, wäre es denkbar, dass ein synergistisches Zusammenspiel mehrerer NLS nötig ist. So konnte für den Kernimport von extern zugeführtem FGF-1 gezeigt werden, dass zwei NLS für einen effizienten Kernimport des Proteins nötig sind. Nach sequenzieller Mutation durch Austausch von Lysinen gegen Alanine in jeweils einer der beiden NLS zeigte sich jeweils ein reduzierter Kernimport im Gegensatz zum Wildtyp (Wesche et al. 2005). Auch für den Glucokortikoid-Rezeptor oder den Transkriptionsfaktor NF-AT2 ist eine Abhängigkeit des Kernimports von der Zusammenarbeit mehrerer NLS beschrieben worden (Picard und Yamamoto 1987, Beals et al. 1997). Das Zusammenspiel mehrerer NLS im Kernimport des PI-3-K  $\gamma$ -Wildtyps könnte auch durch konformationelle Änderungen des Proteins bedingt sein, da nur zur Oberfläche gerichtete Sequenzen als NLS dienen können. Andernfalls ist eine Interaktion der NLS mit seinem Adapterprotein und der damit verbundene Importvorgang nicht möglich. So ließe sich auch der Widerspruch zwischen der starken Kernlokalisierung des N-Terminus und der C2-Domäne und der schwächeren Lokalisation des Wildtyps erklären. Weiterhin ist vorstellbar, dass ein kompetitiver Mechanismus zwischen Kernimport- und Exportsignal existiert, und so mehrere NLS für einen suffizienten Kernimport nötig sind.

Nach Diskussion der für einen Kernimport wichtigen Enzymdomänen stellt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz der Kernlokalisierung der PI-3-K  $\gamma$ . Seit langem ist die Existenz eines intranukleären Phosphoinositid-Stoffwechsels bekannt, der sich in seiner Lokalisation, Regulation und Funktion von dem der Plasmamembran oder anderen cytoplasmatischen Membranen unterscheidet. So lässt sich ein PI-PLC-Zyklus unabhängig von Membranstrukturen im Inneren des Zellkerns nachweisen. Infolge extrazellulärer PDGF oder IGF-1-Stimulation wird PLC $\beta$ 1 aktiviert, wodurch es zur Spaltung von PI-4,5-P<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG kommt (Irvine 2003, Xu et al. 2001). Die Bildung der second-messenger IP<sub>3</sub> und DAG verursacht zum einen die Erhöhung der Kalziumkonzentration im Kern und zum anderen die Translokation von PKC-Isoformen (PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ II) in den Zellkern mit folgender Phosphorylierung von nukleären Zielproteinen wie z.B. Lamin B (Thompson und

Fields 1996, Irvine 2003). Neben seiner Funktion als Substrat für PLC wird PI-4,5-P<sub>2</sub> eine Rolle als nukleärer Interaktionspartner zugeschrieben. So greift es verändernd in die Chromatinstruktur ein, indem es die Interaktion zwischen Chromatin und BAFs verstärkt (Zhao et al. 1998). Es bindet weiterhin an Histon H1 und verstärkt so dessen inhibierende Wirkung auf die Transkription *in-vitro* (Yu et al. 1998). Inwieweit die PI-3-K  $\gamma$  in den intranukleären Phosphoinositid-Stoffwechsel involviert ist, bleibt derzeit noch offen.

Osborne und Mitarbeiter zeigten als erste die Zellzyklus-abhängige Lokalisation von PI-4,5-P<sub>2</sub> in elektronendichten Interchromatin-Granula des Zellkerns, den sogenannten *speckles*, zusammen mit Proteinen wie der RNA Polymerase II und dem splicing-Faktor SC-35 (Osborne et al. 2001). Durch Immunpräzipitations-Experimente konnte die essentielle regulatorische Funktion von PIP<sub>2</sub> im Prozess des RNA-splicings und damit der transkriptionellen Aktivität der Zelle gezeigt werden (Osborne et al. 2001). Interessanterweise finden sich eine Reihe von Enzymen des Phosphoinositid-Stoffwechsels an *speckles* lokalisiert. So ist die Klasse II PI-3-Kinase C2 $\alpha$  in HeLa-Zellen mit nukleären *speckles* assoziiert (Didischenko und Thelen 2001). Auch die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinasen I $\alpha$  und II $\alpha$  sowie die PI-4-Kinase PI4K92 lassen sich zusammen mit ihrem Produkt PI-4,5-P<sub>2</sub> in nukleären *speckles* nachweisen (Boronenkov et al. 1998, Szivak et al. 2006). Aufgrund des hohen PI-4,5-P<sub>2</sub>-Gehaltes in nukleären *speckles*, wäre auch eine Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  an diesen Strukturen denkbar, da PI-4,5-P<sub>2</sub> das Hauptsubstrat *in vivo* darstellt, und so die Bildung von PI-3,4,5-P<sub>3</sub> oder anderen 3-OH-phosphorylierten Phosphoinositiden im Kern möglich. Als Bindungspartner für nukleäres PI-3,4,5-P<sub>3</sub> käme PI-3,4,5-P<sub>3</sub>-Bindungsprotein oder PKC $\zeta$  in Frage (Neri et al. 1999). Insgesamt ist jedoch die Rolle kernlokalisierter PI-3-K  $\gamma$  bisher kaum verstanden und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## **5.2 Zelluläre Lokalisation der PI-3-K $\gamma$ und seiner Domänen in Anwesenheit der regulatorischen Untereinheit p101**

Die bisherigen Untersuchungen anderer Autoren betrachteten ausschließlich die subzelluläre Lokalisation der katalytischen Untereinheit der PI-3-K  $\gamma$  ohne Einfluß der regulatorischen Untereinheit p101. Die Rolle von p101 in der Membrantranslokation, Membranbindung und Enzymaktivierung ist seit seiner Erstbeschreibung 1997 durch Stephens und Mitarbeiter unklar und wird kontrovers diskutiert (Stephens et al 1997). Bekannt ist, dass sich die primär cytosolische Lokalisation der katalytischen Untereinheit unter p101 nicht ändert, wohingegen p101 in Anwesenheit der katalytischen Untereinheit zu einem Großteil aus dem Kern in das Cytosol dirigiert wird (Voigt et al. 2004). Auch wir können nach Expression des EGFP-gekoppelten p110  $\gamma$ -Wildtyps in HEK 293<sub>p101</sub>-Zellen keine Lokalisationsänderung des Proteins feststellen. So zeigt sich ein weiterhin cytoplasmatisches Verteilungsbild mit schwacher Kernlokalisierung ohne Anreicherung an Membranen. In den Zellfraktionierungsexperimenten finden sich keine Unterschiede zur

Expression ohne p101. Nach Expression des N-Terminus, der C2-Domäne, der Ras-Bindungs-Domäne und der Kinase-Domäne ist in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Zellfraktionierungsexperimenten eine Lokalisationsänderung unter p101 nicht nachweisbar. Einzig die helikale Domäne zeigt in der Zellfraktionierung eine Verschiebung vom Kern zum Cytosol in Anwesenheit von p101. In den bisherigen Untersuchungen zur Lokalisation von überexprimiertem p110  $\gamma$ -Wildtyp mit p101 zeigt sich, dass p101 allein keinen Anteil an einer Translokation des Wildtypenzym an die Plasmamembran hat (Brock et al. 2003, Voigt et al. 2004, 2006). Krugmann und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass der N-terminale Teil (aa1-776) von p110  $\gamma$  für dessen Bindung an p101 verantwortlich ist. Dies umfasst den N-Terminus, die Ras-Bindungs-Domäne, die C2-Domäne, die helikale Domäne und einen Teil der Kinase-Domäne. Dabei wäre eine Interaktion von p101 mit einer der genannten Domänen denkbar und könnte die Verschiebung der helikalen Domäne vom Kern in das Cytosol in den Fraktionierungsexperimenten erklären.

## 6 Schlussfolgerungen

Die Expression der EGFP-gekoppelten PI-3-K  $\gamma$  und ihrer Domänen in verschiedenen Säugerzellen und die fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchung sowie subzelluläre Fraktionierung der Transfektionskonstrukte ermöglichte es, die subzelluläre Lokalisation des Enzyms sowie den Einfluss der Proteindomänen auf die Membranbindung und Kernlokalisation besser zu verstehen.

So galt die PI-3-K  $\gamma$  bisher als ein vorrangig cytosolisch lokalisiertes Enzym, dass nach Rezeptorstimulation an die Plasmamembran, dem Ort der Lipidkinasefunktion, transloziert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die PI-3-K  $\gamma$  unabhängig von einer externen Stimulation an der Plasmamembran lokalisiert ist. Alle Domänen außer der C2-Domäne könnten dabei Anteil an der Vermittlung der Bindung haben und verdeutlichen die starke Affinität des Enzyms zu Membranstrukturen. Dies eröffnet eine neue Perspektive auf die subzelluläre Lokalisation und Funktion der PI-3-Kinase  $\gamma$ . Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zum einen darauf hin, dass neben der Plasmamembran auch intrazelluläre Membranstrukturen als Bindungspartner und als Ort der Enzymfunktion dienen können, zum anderen, dass permanent membranständig gebundene inaktive PI-3-K  $\gamma$  direkt durch Rezeptorstimulation aktiviert werden kann. So könnte eine Aktivierung des Enzyms durch G $\beta\gamma$  oder p101 direkt an der Zellmembran oder anderen Membranstrukturen erfolgen und bedürfte keiner vorherigen Translokation an die Membran. Ebenso ist eine Funktion als scaffold-Protein denkbar, indem die PI-3-K  $\gamma$  nach Bindung an Membranen oder Proteine über eine aktivitätsunabhängige Interaktion mit weiteren Bindungspartnern in die Steuerung von zellulären Prozessen eingreifen kann. Fortführende Untersuchungen zur möglichen Lokalisation und Funktion in weiteren subzellulären Kompartimenten wie z.B. intrazellulären Organellen wären ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der zellulären Rolle der PI-3-Kinase  $\gamma$ . Darüber hinaus sollten vertiefende Untersuchungen zur genauen Charakterisierung der Membranbindung der einzelnen Proteindomänen durchgeführt sowie deren Zusammenspiel im Prozess der Bindung anhand von Deletionsstudien einzelner oder mehrerer Domänen untersucht werden. Auf der Grundlage eines tieferen Verständnisses der zellulären Lokalisation der PI-3-K  $\gamma$  ließen sich Möglichkeiten der Bindungsbeeinflussung und damit der Funktionssteuerung entwickeln.

Darüber hinaus deuten die vorliegenden Untersuchungen auf eine funktionelle Rolle der PI-3-K  $\gamma$  im Zellkern hin. Weiterführende Untersuchungen zur bisher kaum verstandenen funktionellen Relevanz kernständiger PI-3-K  $\gamma$  z.B. im kerneigenen Phosphoinositid-Stoffwechsel oder in der Apoptose-Steuerung sollten zukünftig durchgeführt werden. Es wäre dabei interessant, die Kernimportvorgänge und den Regulationsmechanismus im Zellkern genauer zu untersuchen.

Die vorliegenden Ergebnisse der Arbeit lassen jedoch nur Schlüsse auf Überexpressionssysteme in Modelzelllinien zu. Die Übertragung der Ergebnisse auf Zelllinien, welche die PI-3-K  $\gamma$  nativ exprimieren, wäre von großer Bedeutung, da sich so Strategien der medikamentösen Therapie im Bereich der Immunantwort oder kardiovaskulärer Erkrankungen entwickeln und sich unter Umständen alternative pharmakologische Ansätze erarbeiten ließen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Alloatti G, Levi R, Malan D, Del Sorbo L, Bosco O, Barberis L, Marcantoni A, Bedendi I, Penna C, Azzolino O, Altruda F, Wymann M, Hirsch E, Montrucchio G. 2003. Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient hearts are protected from the PAF-dependent depression of cardiac contractility. *Cardiovasc Res.*, 60:242-259.
2. Alloatti G, Marcantoni A, Levi R, Gallo MP, Sorbo LD, Patrucco E, Barberis L, Malan D, Azzolino O, Wymann MP, Hirsch E, Montrucchio G. 2005. Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  controls autonomic regulation of the mouse heart through Gi-independent downregulation of cAMP level. *FEBS Letters*, 579:133-140.
3. Arcaro A, Wymann MP. 1993. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.*, 296:297-301.
4. Attree O, Olivos IM, Okabe I, Bailey LC, Nelson DL, Lewis RA, McInnes RR, Nussbaum RL. 1992. The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature*, 358:239-242.
5. Augsten M, Pusch R, Biskup C, Rennert K, Wittig U, Beyer K, Blume A, Wetzker R, Friedrich KH, Rubio I. 2006. Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane. *EMBO reports*, 7:46-51.
6. Bacqueville D, Deleris P, Mendres C, Pieraggi MT, Chap H, Guillon G, Perret B, Breton-Douillon M. 2001. Characterization of a G Protein-activated Phosphoinositide 3-Kinase in vascular smooth muscle cell nuclei. *J. Biol. Chem.*, 276:22170-22176.
7. Baier R, Bondeva T, Klinger R, Bondev A, Wetzker R. 1999. Retinoic Acid Induces Selective Expression of Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$  in Myelomonocytic U937 Cells. *Cell Growth & Differentiation*, 10:447-456.
8. Balendran A, Currie R, Armstrong CG, Avruch J, Alessi DR. 1999. Evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates phosphorylation of p70 S6 kinase in vivo at Thr-412 as well as Thr-252. *J. Biol. Chem.*, 274:37400-37406.
9. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR. 1997. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.*, 11:824-834.



10. Behrmann I, Smyczek T, Heinrich PC, Schmitz-Van de Leur H, Komyod W, Giese B, Müller-Newen G, Haan S, Haan C. 2004. Janus Kinase (Jak) subcellular localization revisited. *J. Biol. Chem.*, 279:35486-35493.
11. Bence K, Ma W, Kozasa T, Huang XY. 1997. Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by Gq-protein  $\alpha$ -subunit. *Nature*, 389:296–299.
12. Benes CH, Wu N, Elia AEH, Dharia T, Cantley LC, Soltoff SP. 2005. The C2 Domain of PKC $\delta$  is a Phosphotyrosine Binding Domain. *Cell*, 121:271-280.
13. Berman DM, Gilman AG. 1998. Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J. Biol. Chem.*, 273:1269-1272.
14. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res.*, 7:1513-23.
15. Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP. 1998. Bifurcation of Lipid and Protein Kinase Signals of PI-3-K  $\gamma$  to the Protein Kinases PKB and MAPK. *Science*, 282:293-296.
16. Boronenkov IV, Loijens JC, Umeda M, Anderson RA. 1998. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell.*, 9:3547-3560.
17. Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G, Nürnberg B. 2003. Roles of G $\beta\gamma$  in membrane recruitment and activation of p110  $\gamma$  /p101 phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *J. Cell Biol.*, 160:89-99.
18. Brown RA, Domin J, Arcaro A, Waterfield, MD. 1999. Insulin activates the alpha isoform of class II phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 274:14529-14532.
19. Cantley LC, Neel BG. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96:4240-4245.
20. Carpenter CL, Cantley LC. 1998. A flattened face for membranes. *Nat Struct Biol.*, 10:843-5.
21. Chen XS, Funk CD. 2001. The N-terminal „ $\beta$ -barrel“ domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J. Biol. Chem.*, 276:811-818.
22. Chidiac P, Ross EM. 1999. Phospholipase C- $\beta$ 1 directly accelerates GTP hydrolysis by G $\alpha_q$  and acceleration is inhibited by G $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.*, 274:19639–19643.

23. Chiu VK, Bivona T, Hach A, Sajous JB, Silletti J, Wiener H, Johnson RL 2<sup>nd</sup>, Cos AD, Philips MR. 2002. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.*, 5:343-50.
24. Choi JH, Bertram PG, Drenan R, Carvalho J, Zhou HH, Zheng XF. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Rep.*, 3:988-994.
25. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HYM, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveiras-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM. 2002. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, 110:737-749.
26. Czupalla C, Culo M, Müller EC, Brock C, Reusch HP, Spicher K, Krause E, Nürnberg B. 2003. Identification and Characterization of the Autophosphorylation Sites of Phosphoinositides 3-Kinase Isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 278:11536-11545.
27. Deleris P, Bacqueville D, Gayral S, Carrez L, Salles JP, Perret B, Breton-Douillon M. 2003. SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *J. Biol. Chem.*, 278:38884-38891.
28. Didichenko SA, Thelen M. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase C2 $\alpha$  contains a nuclear localization sequence and associates with nuclear speckles. *J. Biol. Chem.*, 276:48135-48142.
29. Domin J, Panaretou C, Waterfield MD. 1995 A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.*, 14: 3339-3348.
30. Downes CP, Walzer S, McConnachie G, Lindsay Y, Batty IH, Lesile NR. 2004 Acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN, by anionic lipids and reactive oxygen species. *Biochemical Society Transactions*, 32:338-342.
31. Drenan RM, Liu X, Bertram PG, Zheng XFS. 2004. FKBP12-Rapamycin-associated protein or mammalian target of Rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, 279:772-778.

32. Essen LO, Perisic O, Lynch DE, Katan M, Williams RL. 1997. A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\delta$ 1. *Biochemistry*, 36:2753-2762.
33. Fields TA, Casey PJ. 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J.*, 321:561–571
34. Flanagan CA, Schnieders EA, Emerick AW, Kunisawa R, Thorner JW, Admon A. 1993. Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*, 262:1444-1448.
35. Franke TF, Cantley LC 1997. Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature*, 390:116-7.
36. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. 1997. Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, 275:665-668.
37. Fruman DA, Snapper SB, Yballe CM, Davidson L, Yu JU, Alt FW, Cantley LC. 1999. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 $\alpha$ . *Science*, 283:393-397.
38. Fujimoto K. 1997. SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem. Cell. Biol.*, 107:87-96.
39. Ghahremani MH, Cheng P, Lembo PM, Albert PR. 1999. Distinct roles for G $\alpha$ i2, G $\alpha$ i3, and G $\beta$  $\gamma$  in modulation of forskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization by dopamine D2S receptors. *J. Biol. Chem.*, 274:9238–9245.
40. Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD. 1986. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature*, 322:641-4.
41. Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemming BA, Barford D. 1999. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell*, 96:99-110.
42. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110:177-189.

43. Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, Wandless TJ, Meyer T. 2006. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and PI(4,5)P<sub>2</sub> lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314:1458-1461.
44. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzoni S, Mantovani A, Altruda F, Wymann M. 2000. Central role for G-Protein-coupled Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in inflammation. *Science*, 287:1049-1053.
45. Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann M, Montrucchio G. 2001. Resistance to thromboembolism in PI-3-K  $\gamma$ -deficient mice. *FASEB J.*, 15:2019-2021.
46. Huang L, Hofer F, Martin GS, Kim SH. 1998. Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nature Struct. Biol.*, 5:422-426.
47. Hunter JJ, Chien KR. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.*, 341:1276-1283.
48. Ikeda SR. 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, 380:255-258.
49. Irvine R. 2003. Nuclear lipid signaling. *Molecular Cell Biology*, 4:349-60.
50. Isakoff SJ, Cardozo T, Adreev J, Li Z, Ferguson KM, Abagyan R, Lemmon MA, Aronheim A, Skolnik EY. 1998. Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *EMBO J.*, 17:5374-5387.
51. Jamora G, Takizawa PA, Zaarour RF, Denesvre C, Faulkner DJ, Malhotra V. 1997. Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins. *Cell*, 91:617-26.
52. Janmey PA, Lamb J, Allen, PG, Matsudaira PT. 1992. Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of gelsolin and villin. *J. Biol. Chem.*, 267:11818-11823.
53. Jordan JD, Carey KD, Stork PJS, Iyengar R. 1999. Modulation of Rap activity by direct interaction of G $\alpha_0$  with Rap1 GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.*, 274:21507-21510.
54. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39:499-509.

55. Katz A, Wu D, Simon MI. 1992. Subunits  $\beta\gamma$  of heterotrimeric G protein activate  $\beta 2$  isoform of phospholipase C. *Nature*, 360:686–689.
56. Kaupp UB, Koch KW. 1992. Role of cGMP and  $\text{Ca}^{2+}$  in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.*, 54 :153-175.
57. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110:163-75.
58. Kirsch C, Wetzker R., Klinger R. 2001. Anionic Phospholipids are involved in membrane targeting of PI 3-Kinase  $\gamma$ . *BBRC*, 282:691-696.
59. Kirch C. 2005. Untersuchungen zur Interaktion der Phosphoinositid-3-Kinase  $\gamma$  mit Lipid-membranen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
60. Klarlund JK, Rameh LE, Cantley LC, Buxton JM, Holik JJ, Sakelis C, Patki V, Corvera S, Czech MP. 1998. Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 273:1859-62.
61. Klippel A, Reinhard C, Kavanaugh WM, Apell G, Escobedo MA, Williams LT. 1996. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4117-4127.
62. Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. 1995. G beta gamma binds directly to the G protein-gated  $\text{K}^+$  channel, IKACH. *J. Biol. Chem.*, 270:29059-29062.
63. Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N, Braselmann S. 1999. Characterizing the Interactions between the two subunits of the p101/p110  $\gamma$  Phosphoinositide 3-Kinase and their role in the activation of this enzyme by  $\text{G}\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.*, 274:17152-17158.
64. Krugmann S, Cooper MA, Williams DH, Hawkins PT, Stephens LR. 2002. Mechanism of the regulation of type IB phosphoinositide 3OH-kinase by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Biochem. J.*, 362:725-731.
65. Kuhn M. 2004. Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res. Cardiol.*, 99:76 – 82.

66. Kular G, Loubtchenkov M, Swigart P, Whatmore J, Ball A, Cockcroft S, Wetzker R. 1997. Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem. J.*, 325:299-301.
67. Kurig B, Shymanets A, Bohnacker T, Prajwal, Brock C, Ahmadian MR, Schäfel M, Gohla A, Hartemeck C, Wymann MP, Jeanclos E, Nürnberg B. 2009. Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase p87/p110 $\gamma$ . *PNAS*, 106:20312-20317.
68. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
69. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. 1994. Structural determinants for activation of the  $\alpha$ -subunit of a heterotrimeric G-protein. *Nature*, 369:621–628.
70. Langhans-Rajasekaran SA, Wan Y, Huang XY. 1995. Activation of Tsk and Btk tyrosine kinases by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92:8601-8605.
71. Lemmon MA. 2003. Phosphoinositide Recognition Domains. *Traffic*, 4:201-213.
72. Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R, Nürnberg B. 1998. G $\beta\gamma$  stimulates Phosphoinositide 3-Kinase- $\gamma$  by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol.Chem.*, 273.7024-7029.
73. Levitzki A. 1986. Beta-adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol. Rev.*, 66:819-854.
74. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. 1987 The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature*, 325:321-326.
75. Lopez-Lluch G, Bird MM, Canas B, Godavac-Zimmerman J, Ridley A, Segal AW, Dekker LV. 2001. Protein kinase C $\delta$  C2-like domain is a binding site for actin and enables actin redistribution in neutrophils. *Biochem. J.*, 357:39-47.
76. Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Yan HY, Yin HL, Chen CS. 1998. Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochemistry*, 37.5738-5745.

77. Lupia E, Goffi A, De Giuli P, Azzolino O, Bosco O, Patrucco E, Vivaldo MC, Ricca M, Wymann MP, Hirsch E, Montrucchio G, Emanuelli G. 2004. Ablation of Phosphoinositide 3-Kinase- $\gamma$  reduces the severity of acute pancreatitis. *American Journal of Pathology*, 165:2003-2011.
78. Macrez N, Mironneau C, Carricaburu V, Quignard JF, Babich A, Czupalla C, Nürnberg B, Mironneau J. 2001. Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms selectively couple receptors to vascular L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Circ. Res.*, 89:692-699.
79. Mc Laughlin S, Murray D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438:605-611.
80. Meier U, Babich A, Nürnberg B. 1999. Roles of non-catalytic subunits in  $\text{G}\beta\gamma$ -induced activation of class I Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms  $\beta$  and  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 274:29317-29317.
81. Majerus PW, Kisseleva MV, Norris FA. 1999. The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.*, 274:10669-10672.
82. Meng EC, Bourne HR. 2001. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol. Sci.*, 22:587-93.
83. Metjian A, Roll RL, Ma AD, Abrams CS. 1999. Agonists cause nuclear Translocation of Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 274:27943-27947.
84. Molendijk AJ, Irvine RF. 1998. Inositide signalling in *Chlamydomonas*: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene. *Plant Mol. Biol.*, 37:53-66.
85. Moodie SA, Paris M, Villafranca E, Kirshmeier P, Willumsen BM, Wolfman A. 1995. Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets. *Oncogene*, 11:447-454.
86. Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS. 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 273:19080-19085.
87. Naccache PH, Levasseur S, Lachance G, Chakravarti S, Bourgoin SG, McColl SR. 2000. Stimulation of human Neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.*, 275:23636-23641.

88. Naga Prasad SV, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. 2000. G $\beta$  $\gamma$ -dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J. Biol. Chem.*, 275:4693-4698.
89. Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, Caron MG, Rockman HA. 2001. Agonist-dependent Recruitment of Phosphoinositide 3-Kinase to the Membrane by  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase 1. *J. Biol. Chem.*, 276:18953-18959.
90. Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, Rockman HA. 2002. Phosphoinositide 3-kinase regulates  $\beta$ 2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/  $\beta$ -arrestin complex. *J. Cell. Biology*, 158:563-575.
91. Naga Prasad SV, Jayatilleke A, Madamanchi A, Rockman HA. 2005. Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates  $\beta$ -adrenergic receptor endocytosis. *Nature Cell Biology*, 7:785-796.
92. Nassar N, Horn G, Herrmann C, Scherer A, McCormick F, Wittinghofer A. 1995. The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature*, 375:554-560.
93. Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80:249–257.
94. Neri LM, Martelli AM, Boragatti P, Colamussi ML, Marchisio M, Capitani S. 1999. Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC-zeta translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J.*, 15:2299-310.
95. Nombela-Arrieta C, La Calle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megias D, Marques M, Carrera AC, Manes S, Fukui Y, Martinez-A C, Stein JV. 2004. Differential Requirements for DOCK2 and Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  during T and B Lymphocyte Homing. *Immunity*, 21:429-441.
96. Norris FA, Auethavekiat V, Majerus PW. 1995. The isolation and characterization of cDNA encoding human and rat brain inositol polyphosphate 4-phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 270:16128-16133.
97. Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, Schiavo G. 2001. Nuclear PI-4,5-P<sub>2</sub> assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J. Cell Sci.*, 114:2501-2511.



98. Ohto T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T. 2005. Identification of novel cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>s, murine cPLA<sub>2</sub>δ, ε and ζ, which form a gene cluster with cPLA<sub>2</sub>β. *J. Biol. Chem.*, 280:24576-24583.
99. Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL. 2000. Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase γ. *Cell*, 103:931-943.
100. Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150:PtdIns 3-kinase complex. *J. Biol. Chem.*, 272:2477-2485.
101. Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. 2004. PI-3-K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and-independent effects. *Cell*, 118:375-387.
102. Pepio AM, Fan X, Sossin WS. 1998. The role of C2 domains in Ca<sup>2+</sup>-activated and Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase Cs in alypsia. *J. Biol. Chem.*, 273:19040-19048.
103. Pepio AM, Sossin WS. 2001. Membrane translocation of novel protein kinase Cs is regulated by phosphorylation of the C2 domain. *J. Biol. Chem.*, 276:3846-3855.
104. Perrino C, Naga Prasad SV, Schroder JN, Hata JA, Milano C, Rockman HA. 2005. Restoration of β-adrenergic receptor signaling and contractile function in heart failure by disruption of the βARK1/Phosphoinositide 3-kinase complex. *Circulation*, 111:2579-2587.
105. Picard D, Yamamoto KR. 1987. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO*, 6:3333-3340.
106. Pirola L, Zvelebil MJ, Bulgarelli-Leva G, Van Obberghen E, Waterfield MD, Wymann MP. 2001. Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase γ (PI3Kγ) *J. Biol. Chem.*, 276:21544-21554.
107. Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. 2003. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.*, 160:165-170.
108. Prior IA, Parton RG, Hancock JF. 2003. Observing cell surface signaling domains using electron microscopy. *Science STKE* 2003, PL9.

109. Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ. 1995. A direct interaction between G-protein  $\beta\gamma$  subunits and the Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 270:4251–4254
110. Rameh LE, Tolias KF, Druckworth BC, Cantley LC. 1997. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature*, 390:192-196.
111. Rameh LE, Cantley LC. 1999. The Role of Phosphoinositide 3-kinase Lipid Products in Cell Function. *J. Biol. Chem.*, 274:8347-8350.
112. Rhee SG, Bae YS. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, 272:15045-15048.
113. Robinson FL, Dixon JE. 2005. The phosphoinositide-3-phosphatase MTMR2 associates with MTMR13, a membrane-associated pseudophosphatase also mutated in type 4B Charcot-Tooth disease. *J. Biol. Chem.*, 280:31699-31707.
114. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. 2002. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415:206-212.
115. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370:527-532.
116. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with ras and by point mutation. *EMBO J.*, 15:2442-2451.
117. Rubio I, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Wetzker R. 1997. Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ . *Biochem. J.*, 326:891-895.
118. Sabatini DM, Barrow RK, Blackshaw S, Burnett PE, Lai MM, Field ME, Bahr BA, Kirsch J, Betz H, Snyder SH. 1999. Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science*, 284:1161-1164.
119. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
120. Sanchez-Bautista S, Marin-Vicente C, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S. 2006. The C2 domain of PKC $\alpha$  is a Ca<sup>2+</sup>-dependent PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sensing domain: A new insight into an old pathway. *J. Mol. Biol.*, 362:901-914.
121. Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103:211–225.

122. Schlörmann W, John M, Steiniger F, Westermann M, Richter W. 2007. Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. *Histochem. Cell. Biol.*, 127:633-639.
123. Schmidt C, Schilli-Westermann M, Klinger R, Kirsch C. 2010. Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  has multiple phospholipid binding sites. *Protein J.*, 29:127-135.
124. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD. 1993. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science*, 260:88-91.
125. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S. 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.*, 19:2537-2548.
126. Song C, Hu CD, Masago M, Kariyai K, Yamawaki-Kataoka Y, Shibatohe M, Wu D, Satoh T, Kataoka T. 2001. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.*, 276:2752-2757.
127. Stahelin R, Rafter JD, Das S, Cho W. 2003. The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C $\alpha$  and group Iva cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, 278:12452-12460.
128. Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC, Hawkins PT. 1994. A novel Phosphoinositide 3 Kinase Activity in myeloid-derived cells is activated by G Protein  $\beta\gamma$  subunits. *Cell*, 77:83-93.
129. Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka S, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT. 1997. The G $\beta\gamma$  Sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, 89:105-114.
130. Sternweis PC. 1994. The active role of  $\beta\gamma$  in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 6:198–203.
131. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 266:1792-1803.
132. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nürnberg B, Gierschik P, Seedorf K, Hsuan JJ, Waterfield MD, Wetzker R. 1995. Cloning and Characterization of a G Protein-Activated Human Phosphoinositide-3 Kinase. *Science*, 269:690-693.

133. Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP. 1997. Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem. J.*, 324:489-495.
134. Suire S, Hawkins P, Stephens L. 2002. Activation of Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$  by Ras. *Current Biology*, 12:1068-1075.
135. Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, Stephens L. 2005. P84, a new G $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the Type IB Phosphoinositide 3-Kinase p110  $\gamma$  *Current Biology*, 15:566-570.
136. Sziviak I, Lamb N, Heilmeyer LM. 2006. Subcellular localization and structural function of endogenous phosphorylated phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K92). *J. Biol. Chem.*, 281:16740-16749.
137. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 36 :461-480.
138. Takesono A, Cismowski MJ, Ribas C, Berhard M, Chung P, Hazard S<sup>3rd</sup>, Duzic E, Lanier SM. 1999. Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 274:33202-33205.
139. Tang X, Downes CP. 1997. Purification and Characterization of G $\beta\gamma$ -responsive Phosphoinositide 3-Kinases from Pig Platelet Cytosol. *J. Biol. Chem.*, 272:4193–4199.
140. Thompsen LJ, Fields AP. 1996.  $\beta$ II-protein kinase C is required for the G2/M phase transition of cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 271:15045-15053.
141. Toker A. 2002. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59:761-779.
142. Tolias KF, Cantley LC, Carpenter CL. 1995. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.*, 270:17656-17659.
143. Tolias KF, Rameh LE, Ishihara H, Skibasaki Y, Chen J, Prestwich GD, Cantley LC, Carpenter CL. 1998. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases synthesize the novel lipids phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 5-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 273:18040-18046.
144. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experim. Cell Res.*, 253:239-254.

145. Vecchione C, Patrucco E, Marino G, Barberis L, Poulet R, Aretini A, Maffei A, Gentile MT, Storto M, Azzolino O, Brancaccio M, Colussi GL, Bettarini U, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Wymann MP, Hirsch E, Lembo G. 2005. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI-3-K  $\gamma$ . *J.E.M.*, 201:1217-1228.
146. Voigt P, Brock C, Nürnberg B, Schaefer M. 2005. Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Biol. Chem.*, 280:5121-5127.
147. Voigt P, Dorner MB, Schaefer M. 2006. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J. Biol. Chem.*, 28:9977-86.
148. Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck R, Mac-Dougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, Domin J, Panaretou C, Waterfield MD. 1995. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.*, 14:3339-3348.
149. Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL. 1999. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*, 402:313-320.
150. Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. 2002. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C $\delta$ 1. *Biochem. J.*, 263:657-666.
151. Wenthe S. 2000. Gatekeepers of the nucleus *Science*, 288:1374-1377.
152. Wesche J, Malecki J, Wiedlocha A, Ehsani M, Marcinkowska E, Nilsen T, Olsnes S. 2005. Two nuclear localisation signals required for transport from the cytosol to the nucleus of externally added FGF-1 translocated into cells. *Biochemistry*, 44:6071-6080.
153. Whitman M, Kaplan DR, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts TM. 1985. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*, 315:239-242.
154. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L. 1988. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, 332:644-646.

155. Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF. 1996. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, 381:796-800.
156. Wurmser AE, Gary JD, Emr SD. 1999. Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J. Biol. Chem.*, 274:9129-9132.
157. Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G. 1996. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.*, 16:1722-33.
158. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. 2003. Phosphoinositide 3-kinase signalling- which way to target. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 24:366-376.
159. Xu A, Suh PG, Marmy-Conus N, Pearson RB, Seok OY, Cocco L, Gilmour RS. 2001. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.*, 9:2981-2990.
160. Yaffe MB, Elia AEH. 2001. Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 13:131-138.
161. Yu W, Cassara J, Weller PF. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmatic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes und other myeloid-derived cells. *Blood*, 95:1078-1085.
162. Yu H, Fukami K, Watanabe Y, Ozaki C, Takanawa T. 1998. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histone H1. *Eur. J. Biochem.*, 251:281-287.
163. Zhang X, Herring CJ, Romano PR, Szczepanowska J, Brzeska H, Hinnebusch AG, Qin J. 1998. Identification of phosphorylation sites in proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, 70:2050-2059.
164. Zhao K, Wang W, Rando OJ, Xue Y, Swiderek K, Kuo A, Crabtree GR. 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell*, 95:625-636.
165. Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA. 1994. Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.*, 269:18727-18730.

## 8 Anhang

### Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. Klinger, Dr. Cornelia Kirsch,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar und mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 21. Mai 2010

Unterschrift

## Lebenslauf

Name, Vorname: Wachowiak, Stefan  
Geburtsdatum: 26. Oktober 1979  
Geburtsort: Forst  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder  
Wohnhaft in: 07745 Jena, Magdelstieg 5

1986 – 1996 Germanus-Theiss-Schule Döbern

1996 – 1999 Erwin-Strittmatter-Gymnasium Spremberg, Abitur

1999 – 2000 Zivildienst: Pflegedienst in der Caritas-Sozialstation Döbern

10/2000 – 12/2006 Studium der Humanmedizin an der Friedrich Schiller  
Universität Jena

12/2006 Ärztliche Prüfung, Abschluss des Studiums der Humanmedizin  
an der Friedrich Schiller Universität Jena, Approbation als Arzt

01/2007 – 06/2007 Assistenzarzt Klinik für Innere Medizin I / Uniklinikum Jena  
seit 07/2007 Assistenzarzt Asklepios Fachklinikum Stadtroda, Klinik für  
Allgemeine Psychiatrie, Psychotherapie und Suchterkrankungen

Jena, 21. Mai 2010

Unterschrift



## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Klinger für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie den wertvollen und immer motivierenden Anregungen und die Unterstützung bei der Ausführung meiner Dissertationsarbeit.

Weiterhin danke ich im besonderem Maße Frau Dr. C. Kirsch für die hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeiten, dem offenen Dialog und Austausch untereinander, den zielführenden Diskussionen während der theoretischen und praktischen Realisierung meiner Arbeit sowie ihrem jederzeit offenen Ohr und der Möglichkeit jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung zu stehen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. C. Schmidt für die zahlreichen Anregungen und Tipps während den experimentellen Arbeiten, Herrn Prof. Dr. K. Benndorf und Herrn Prof. Dr. C. Biskup für die Bereitstellung und Einweisung in das Laser-Scanning-Mikroskop, sowie Herrn PD Dr. M. Westermann für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie II und I danke ich herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und Atmosphäre der offenen Labortür, insbesondere den MTAs Frau M. Schilli-Westermann und Frau G. Eiselt sowie Frau Kreil für ihre großen und vielen kleinen Hilfestellungen, weiterhin Herrn Dr. M. Augsten und Herrn Dr. S. Krause für ihre vielen Ratschläge und Anregungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau für ihre Unterstützung in den Jahren der Arbeit, für ihre Ausdauer und ihr geduldiges Verständnis, wenn wieder Nächte und Wochenenden im Labor verbracht wurden, bedanken.